



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STABILITA VYBRANÝCH MYKOTOXINŮ V PIVU

STABILITY OF SELECTED MYCOTOXINS IN BEER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Taťána Štáblová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1451/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Taťána Štáblová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Stabilita vybraných mykotoxinů v pivu

Zadání diplomové práce:

Cílem práce je posoudit stabilitu mykotoxinů v pivech v závislosti na čase.

1. Vypracování literární rešerše k dané problematice
2. Optimalizace extrakce vybraných mykotoxinů v pivu
3. Možnosti stanovení vybraných mykotoxinů v pivu
4. Monitoring vybraných mykotoxinů ve vzorcích piv
5. Zpracování naměřených dat

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Taťána Štáblová
student(ka)

Ing. Sylvie Běláková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity plísní, které napadají obiloviny jako např. ječmen, ze kterého se mykotoxiny následně dostávají do piva. Předložená práce se zaměřuje na mykotoxiny – ochratoxin A, deoxynivalenol a zearalenon, které se v pivě mohou vyskytovat.

První část této diplomové práce se skládá z literární rešerše, která popisuje mykotoxiny všeobecně, poukazuje na jejich výskyt, prevenci jejich vzniku a podává informace o jejich fyzikálně chemických vlastnostech a toxicitě. Dále rešerše zahrnuje základ technologie výroby sladu a piva, výskyt mykotoxinů v pivovarských surovinách a pivu, a popisuje změny koncentrace mykotoxinů napříč výrobou sladu a piva. Další část se zabývá možnostmi stanovení mykotoxinů v ječmeni, sladu a pivě, srovnává jednotlivé metody jejich stanovení a poukazuje na mnohá úskalí některých analýz.

Experimentální část práce se věnuje stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu v různých druzích piva pomocí UPLC-FLR, HPLC-MS a ELISA. Instrumentální techniky jsou zvalidovány a získané výsledky jsou porovnány s výsledky z literatury.

Cílem diplomové práce je posoudit stabilitu ochratoxinu A a deoxynivalenolu v pivě v závislosti na čase. Získané výsledky ukazují, že ke změnám koncentrace ochratoxinu A v čase dochází, nicméně tyto změny nemají žádný trend. Celkově došlo ke snížení koncentrace u 47 % vzorků a ke zvýšení u 28 % z nich. U zbylých vzorků se koncentrace neměnila. Koncentrace deoxynivalenolu se v čase nemění.

Jedním z dalších cílů diplomové práce je monitoring vybraných mykotoxinů v pivě. Průměrná koncentrace ochratoxinu A ve vzorcích byla 39 ng/l a deoxynivalenolu 9,9 µg/l. Zearalenon se při stanovení kapalinovou chromatografií nevyskytoval v žádném vzorku. Všechny výsledky jsou v souladu s literaturou.

Dále se práce věnuje srovnání různých analytických postupů ke stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu. Je porovnána screeningová metoda ELISA s UPLC-FLR a HPLC-MS. Stanovení ochratoxinu A metodou ELISA se ukázalo jako časově náročné, nicméně výsledky odpovídaly instrumentální technice. ELISA nadhodnocovala výsledky stanovení obsahu deoxynivalenolu v pivě o 363–697 % a u zearalenonu byly nalezeny falešně pozitivní výsledky.

KLÍČOVÁ SLOVA

mykotoxiny, pivo, deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenon, UPLC-FLR, HPLC-MS

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds, which attack cereals, for example barley, from which mycotoxins then get to beer. This submitted work is focused on ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone, which can occur in beer.

The first part of this master's thesis consists of literary research, which describes mycotoxins in general, points out their occurrence, prevention of their formation and delivers information about their physical and chemical properties and toxicity. Furthermore, the research contains basis of malt and beer technology, the occurrence of mycotoxins in beer and raw materials for its production. The research describes changes in concentration of mycotoxins across malt and beer production. The next part deals with possibilities of determination of mycotoxins in barley, malt and beer, compares individual methods of their determination and points out many difficulties of some analyses.

The experimental part of this work pursues determination of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone in different types of beer with the help of UPLC-FLR, HPLC-MS and ELISA. Instrumental techniques are validated and gathered results are compared with the results in literature.

The goal of this master's thesis is to assess the stability of ochratoxin A and deoxynivalenol in beer over time. The gained results show that there are changes in the concentration of ochratoxin A over time, nevertheless those changes show no pattern. Overall, there was a decrease in concentration in 47 % of the samples and an increase in 28 % of them. In the rest of the samples the concentration did not change. The concentration of deoxynivalenol does not change over time.

One of the other goals of this thesis is monitoring of selected mycotoxins in beer. The average concentration of ochratoxin A in the samples was 39 ng/l and deoxynivalenol 9,9 µg/l. Zearalenone did not occur in any of the samples when determined by liquid chromatography. All results agree with literature.

Next, the thesis compares different analytical methods for determination of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone. The screening method ELISA is compared to UPLC-FLR and HPLC-MS. The determination of ochratoxin A by ELISA has shown to be time consuming, nevertheless the results responded to instrumental technique. ELISA overestimated the results of determination of deoxynivalenol in beer by 363–697 % and with zearalenone there were found false positive results.

KEYWORDS

mycotoxins, beer, deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenone, UPLC-FLR, HPLC-MS

ŠTÁBLOVÁ, Taťána. *Stabilita vybraných mykotoxinů v pivu* [online]. Brno, 2020 [cit. 2020-05-22]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/124070>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Sylvie Běláková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce, paní Ing. Sylvii Bělákové, Ph.D., za odborné vedení, vstřícný přístup a poskytování cenných rad a připomínek v průběhu řešení diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Marku Pernicovi, Ph.D. a Ing. Rastislavu Boškovi za rady poskytnuté jak při přípravě vzorků, tak při samotné analýze. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Jaromíru Pořízkovi, Ph.D. za pomoc při zpracování výsledků.

Diplomová práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO1918.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	10
2.1. Mykotoxiny	10
2.1.1. Dělení	10
2.1.2. Výskyt	11
2.1.3. Maskované mykotoxiny	12
2.1.4. Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách	13
2.1.5. Prevence kontaminace a možnosti snížení obsahu mykotoxinů v potravinách..	14
2.1.6. Legislativa	15
2.2. Charakteristika vybraných mykotoxinů.....	15
2.2.1. Aflatoxiny.....	15
2.2.2. Ochratoxin A	16
2.2.3. Fumonisin	17
2.2.4. Zearalenon.....	17
2.2.5. Trichotheceny	17
2.3. Mykotoxiny v pivovarnictví	19
2.4. Mykotoxiny v pivovarských surovinách	20
2.4.1. Ječmen.....	20
2.4.2. Chmel	20
2.4.3. Slad.....	21
2.5. Změna koncentrace mykotoxinů v průběhu výroby piva	23
2.5.1. Deoxynivalenol a deoxynivalenol-3-glukosid	23
2.5.2. T-2 a HT-2 toxin	24
2.5.3. Ochratoxin A	24
2.5.4. Zearalenon	25
2.6. Možnosti stanovení mykotoxinů v pivovarských surovinách a pive.....	25
2.6.1. Vzorování	27
2.6.2. Extrakce.....	27
2.6.3. Přechištění	28
2.6.4. Plynová chromatografie	28
2.6.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	28

2.6.6.	Ultra účinná kapalinová chromatografie	29
2.6.7.	ELISA.....	29
2.7.	Statistické zpracování experimentálních dat	31
2.7.1.	Testování statistických hypotéz	31
2.7.2.	Shapirův-Wilkův test.....	31
2.7.3.	Deanův-Dixonův Q test.....	31
2.7.4.	Korelace	31
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1.	Seznam chemikálií.....	32
3.2.	Přístroje a zařízení	32
3.3.	Popis analyzovaných vzorků	33
3.4.	Stanovení ochratoxinu A pomocí UPLC-FLR	34
3.4.1.	Validace metody UPLC-FLR.....	34
3.4.2.	Příprava certifikovaného referenčního materiálu k analýze OTA.....	35
3.4.3.	Příprava kalibračních roztoků OTA	35
3.4.4.	Příprava vzorků k analýze OTA pomocí UPLC-FLR	36
3.4.5.	Analýza vzorků pív UPLC-FLR	36
3.5.	Stanovení ochratoxinu A pomocí metody ELISA	37
3.5.1.	Příprava vzorků k analýze OTA pomocí ELISA.....	38
3.5.2.	Analýza vzorků pív	38
3.5.3.	Parametry metody ELISA	38
3.5.4.	Vyhodnocení výsledků	38
3.6.	Stanovení deoxynivalenolu pomocí metody HPLC-MS	39
3.6.1.	Příprava kalibračních roztoků deoxynivalenolu a deoxynivalenol-3-glukosidu	39
3.6.2.	Příprava vzorků k analýze deoxynivalenolu pomocí HPLC-MS	39
3.6.3.	Analýza vzorků pív HPLC-MS	39
3.7.	Stanovení deoxynivalenolu pomocí metody ELISA	40
3.7.1.	Příprava vzorků k analýze DON pomocí ELISA	40
3.7.2.	Analýza vzorků pív	41
3.7.3.	Parametry metody ELISA	41
3.7.4.	Vyhodnocení výsledků	41
3.8.	Stanovení zearalenonu pomocí metody HPLC-MS.....	41
3.8.1.	Příprava kalibračních roztoků ZON	41

3.8.2.	Příprava vzorků k analýze ZON pomocí HPLC-MS	41
3.8.3.	Analýza vzorků pív HPLC-MS	41
3.9.	Stanovení zearalenonu pomocí metody ELISA.....	42
3.9.1.	Příprava vzorků k analýze ZON pomocí ELISA.....	42
3.9.2.	Analýza vzorků pív	43
3.9.3.	Parametry metody ELISA	43
3.9.4.	Vyhodnocení výsledků	43
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	44
4.1.	Validace instrumentálních metod	44
4.1.1.	Ochratoxin A	44
4.1.2.	Deoxynivalenol a deoxynivalenol-3-glukosid	47
4.1.3.	Zearalenon	51
4.2.	Studium stability mykotoxinů v pivu	52
4.2.1.	Ochratoxin A v pivu	52
4.2.2.	Deoxynivalenol v pivu	58
4.2.3.	Zearalenon v pivu	64
4.2.4.	Společný výskyt sledovaných mykotoxinů v pivech	66
5.	ZÁVĚR.....	67
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	77

1. ÚVOD

Pivovarnictví se v České republice řadí mezi významné obory potravinářského průmyslu, ročně se zde vyrobí přes 20 milionů hektolitrů piva. Samotná technologie výroby se skládá ze tří hlavních úseků – výroby mladiny, kvašení mladiny a závěrečných úprav piva. Základními surovinami pro výrobu piva jsou slad, chmel, voda a pivovarské kvasinky. Extrakcí se ze sladu do piva však mohou dostávat mykotoxiny, které představují potenciální nebezpečí pro zdraví člověka, a proto je nutné předejít jejich vzniku.

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* a *Alternaria*, které se za vhodných klimatických podmínek vyskytují na mnoha potravinách a surovinách pro výrobu potravin, zejména pak v obilovinách jako je pšenice nebo ječmen, dále v kukuřici, rýži, luštěninách nebo koření.

Mykotoxiny jsou toxické přírodní látky, jejichž toxicita se značně liší v závislosti na jejich typu, délce jejich působení i dávce a aktuálním zdravím postiženého jedince. Některé mykotoxiny mohou způsobovat zvracení a bolesti břicha, jiné mohou mít mutagenní, hepatotoxické až karcinogenní účinky.

Mezi nejvýznamnější mykotoxiny ve sladařství a pivovarnictví patří trichotheceny, např. deoxynivalenol, T-2 a HT-2 toxin a v menší míře aflatoxiny, ochratoxin A, fumonisiny a zearalenon. Mykotoxiny se do piva dostávají z kontaminovaného ječmene a sladu, proto by se mělo při výrobě sladu a piva dbát na kvalitu těchto surovin – nepoužívat plesnivý ječmen nebo slad a skladovat je za vhodných podmínek. Převážná část mykotoxinů je termostabilní a během výroby sladu, piva či jiných potravin většinou se změnou teploty nedochází k výrazným změnám v jejich koncentraci.

Cílem diplomové práce je posoudit, jestli se koncentrace vybraných mykotoxinů – ochratoxinu A a deoxynivalenolu v pivě mění s časem. Jedním z dalších cílů diplomové práce je monitoring vybraných mykotoxinů v pivě, kdy jsou získané výsledky porovnávány s českou i zahraniční literaturou. Dále se práce věnuje srovnání různých analytických postupů ke stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu. Zmíněna je také optimalizace extrakce deoxynivalenolu pomocí různých typů imunoafinitních kolonek.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity vláknitých mikroskopických hub neboli plísní. Jedná se o toxické látky přírodního původu, které vykazují imunosupresivní, karcinogenní, genotoxické, teratogenní a mutagenní účinky i při nízkých koncentracích. Mykotoxiny tvoří pestrá skupina sloučenin nebiokovinné povahy s relativně nízkou molekulovou hmotností (do 500 Da). Přenos mykotoxinů do potravin, případně jejich další uvolňování, ke kterému dochází během různých technologických procesů, znamená v potravinářství závažný problém a zdravotní riziko pro konzumenty [1–3].

2.1.1. Dělení

Mykotoxiny jsou jak po chemické, tak toxikologické stránce velmi různorodé, a proto je jejich dělení podle jediného parametru velmi obtížné. Mohou se klasifikovat například podle své chemické struktury (cyklopeptidy, polyketokyseliny, aj.), podle svých producentů – plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* a *Fusarium*; podle toxicity, a nakonec podle mechanismu biosyntézy (polyketidová dráha, syntéza z kyseliny mevalonové). Příklad jejich dělení je zobrazen v tabulkách 1 a 2 [1, 2, 4].

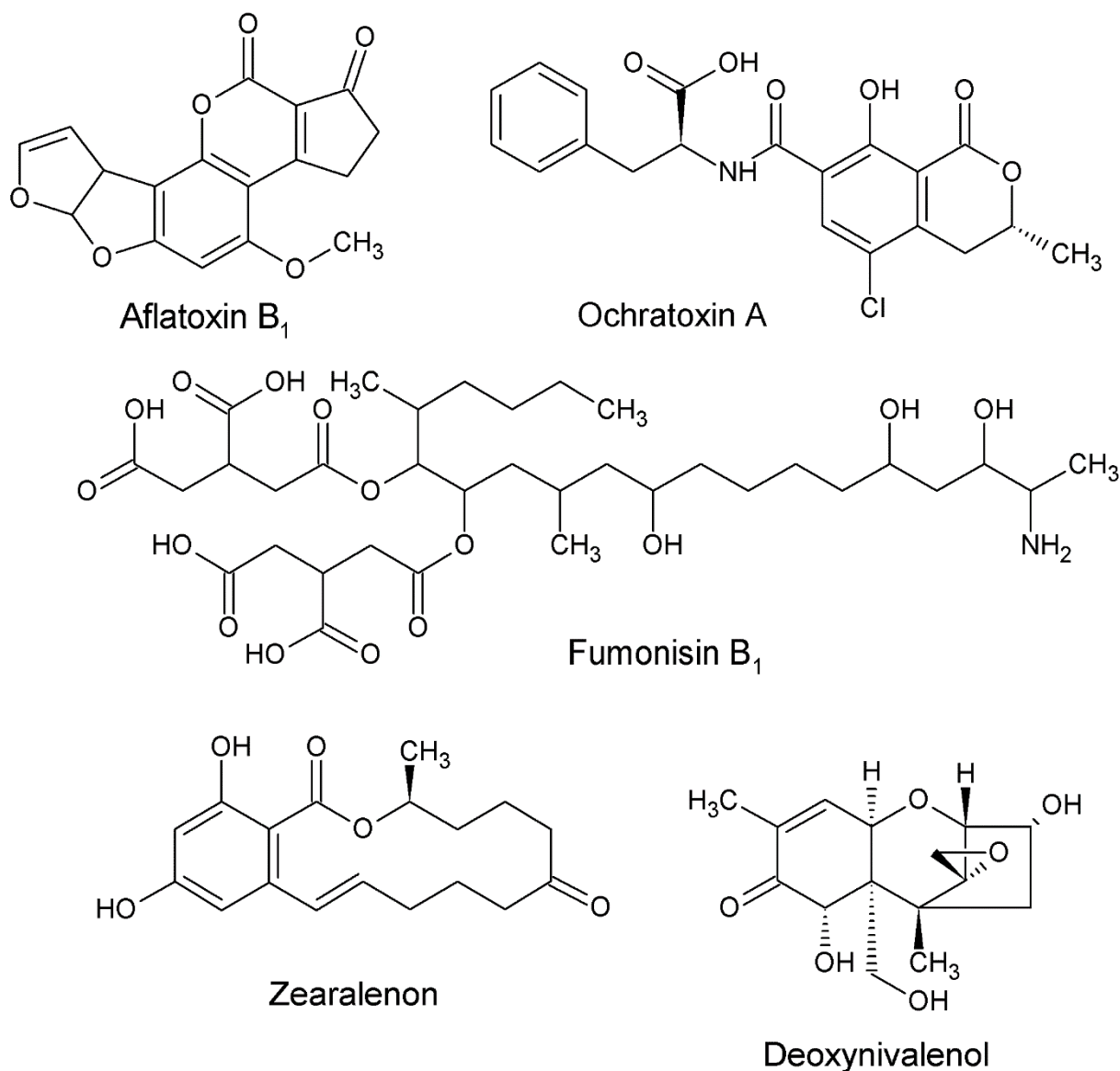
Tabulka 1 Dělení mykotoxinů podle jejich akutní toxicity pro laboratorní zvířata [1]

toxicita	mykotoxin
silně toxické (LD ₅₀ cca jednotky mg/kg tělesné hmotnosti)	aflatoxiny, ochratoxin A, patulin, T-2 toxin
středně toxické (LD ₅₀ cca desítky mg/kg tělesné hmotnosti)	citrinin, kyselina cyklopiazonová
slabě toxické (LD ₅₀ cca stovky mg/kg tělesné hmotnosti)	zearalenon, deoxynivalenol

Tabulka 2 Dělení mykotoxinů podle jejich toxicity k cílovým orgánům [1]

toxický účinek	mykotoxiny
dermatotoxiny	trichotheceny
estrogeny	zearalenon
genotoxiny	aflatoxiny, ochratoxin A, citrinin, zearalenon, patulin, trichotheceny, fumonisiny, fusarin C
hematotoxiny	aflatoxiny, ochratoxin A, zearalenon, trichotheceny
hepatotoxiny	aflatoxiny
imunotoxiny	aflatoxiny, ochratoxin A, trichotheceny, patulin
nefrotoxiny	citrinin, ochratoxin A
neurotoxiny	fumonisiny
toxiny gastrointestinálního traktu	trichotheceny

Mykotoxiny zmiňované v této práci můžeme rozdělit podle jejich nejvýznamnějších producentů – aflatoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus*, ochratoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus* nebo *Penicillium* a nakonec fumonisiny a trichotheceny produkované plísněmi rodu *Fusarium*. Zástupci těchto rodů, kteří jsou schopni produkovat mykotoxiny jsou zvýhodněni v boji o potravu a o přežití [4, 10].



Obrázek 1 Struktura vybraných mykotoxinů

2.1.2. Výskyt

Mykotoxiny jsou kontaminanty především potravin a krmiv. Jsou obsaženy hlavně v obilovinách, ořeších a luštěninách a za vhodných podmínek se mohou vyskytovat po celém světě. Spory plísní se běžně nacházejí v půdě, odkud postupně přecházejí do celé rostliny, a nakonec infikují zrna. Dochází tak ke znehodnocení obilovin, které jsou hlavním zdrojem mykotoxinů v lidské výživě, a snížení výtěžku zemědělské produkce [4, 6].

Plísně rodu *Penicillium* patří k nejrozšířenějším plísním teplého a mírného klimatu. Zástupci tohoto rodu jsou častými kontaminanty potravin, protože jejich spory jsou takřka všudypřítomné. Mykotoxiny produkované zástupci tohoto rodu, patří mezi skladištní mykotoxiny. Naproti tomu plísně rodu *Fusarium* a *Alternaria* napadají obiloviny již na poli, ještě před sklizní. Mykotoxiny vytvořené těmito vláknitými mikromycetami se nazývají polní mykotoxiny [4, 6].

V potravinách živočišného původu se mohou vyskytovat rezidua mykotoxinů. Důvodem je podání kontaminovaného krmiva hospodářským zvířatům, jejichž maso nebo mléko se poté použije při výrobě potravin. U masných výrobků mohou být dalším zdrojem mykotoxinů kořenicí směsi nebo plísně na povrchu výrobku [4, 6].

Tabulka 3 Producenti vybraných mykotoxinů a jejich výskyt [7]

mykotoxin	producent	kontaminovaný produkt
aflatoxiny (B1, B2, G1, G2)	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i>	rýže, arašidy, pistáciové ořechy, tabák, semena olejnin
ochratoxin A	<i>Aspergillus alliaceus</i> , <i>A. auricomus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium cyclopium</i>	rýže, žito, oves, pohanka, ječmen, oves, proso, ořechy, káva, kakao, koření
fumonisin	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium anthophilum</i> , <i>F. dlamini</i> , <i>F. moniliforme</i>	kukuřice, rýže, fazole
patulin	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Byssoschlamys sp.</i>	jablka, hrušky, vinná réva, višně
zearalenon	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i>	pšenice, rýže, ječmen, oves
trichothecen typu A (T-2 toxin)	<i>Cephalosporium sp.</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. myrothecium</i>	rýže, žito, ječmen, oves, proso, pšenice, triticales
trichothecen typu B (deoxynivalenol)	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	kukuřice, rýže, žito, pšenice, pohanka, triticales

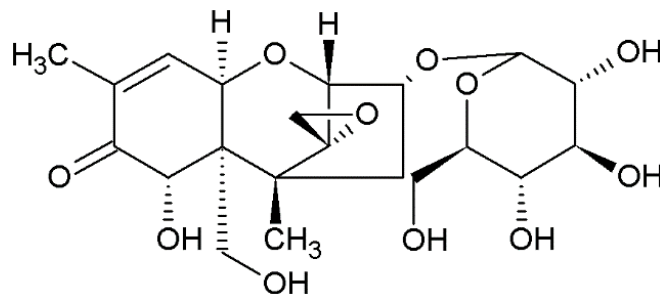
2.1.3. Maskované mykotoxiny

Kromě volných forem mykotoxinů existují i formy vázané. Tyto formy vznikají v rámci detoxifikačního procesu rostlin, které jsou napadeny toxigenními vláknitými houbami. V rostlinách dochází k reakcím, které přeměňují toxiny s aktivní funkční skupinou na jejich deriváty a konjugáty. Toxicita vzniklých sloučenin může být těmito procesy snížena [3].

Ačkoliv mohou být maskované mykotoxiny pro rostliny méně toxické, nemusí to tak platit i pro konzumenty těchto rostlin. Potenciální nebezpečí maskovaných mykotoxinů spočívá v jejich hydrolýze během trávení, kdy může dojít k uvolnění původního volného mykotoxinu, který je toxický. Přesné mechanismy přeměn maskovaných mykotoxinů a jejich působení ještě nejsou zcela známy [10].

Název maskované mykotoxiny dostaly tyto látky vzhledem k jejich odlišným fyzikálně chemickým vlastnostem, kvůli kterým unikaly používaným analytickým metodám. Maskované mykotoxiny mají například vyšší polaritu než volné formy mykotoxinů, a proto byly při použití

běžných extrakčních činidel hůře extrahovatelné. Navíc dříve nebyly dostupné standardy těchto forem mykotoxinů. Nejvíce prozkoumaný je konjugát deoxynivalenolu, deoxynivalenol-3-glukosid, jehož struktura je zobrazena na obrázku 2. Známý jsou také glykosidy zearalenonu, ochratoxinu A a nivalenolu [3].



Obrázek 2 Struktura deoxynivalenol-3-glukosidu

Existuje také pojem modifikovaný mykotoxin používaný pro sloučeniny, které vznikly nejen z volných mykotoxinů obrannými mechanismy rostlin, nýbrž i při zpracování potravin nebo přeměnou v rámci živočišného metabolismu. Příkladem zástupců modifikovaných mykotoxinů jsou 3-acetyl-deoxynivalenol, 4S-hydroxyochratoxin A a α -zearalenol-glukosid [3].

2.1.4. Faktory ovlivňující výskyt mykotoxinů v potravinách

Podmínky, které ovlivňují růst plísní a produkci mykotoxinů u rostlin během růstu, před sklizní, během sklizně, při přepravě a během skladování mohou být shrnuty v pěti faktorech – vlhkosti, teplotě, aktivitě vody, přítomnosti kyslíku a druhu substrátu [6].

K růstu plísní a tvorbě mykotoxinů může docházet jak na poli, tak během skladování. Polní druhy plísní se rozvíjejí na různých rozkládajících se substrátech a ke svému růstu vyžadují vysokou relativní vlhkost (20–25 %). K zástupcům polních plísní patří kupříkladu některé kmeny rodu *Fusarium*, které produkují fumonisiny a trichotheceny. Plísně, které se vyskytují na skladovaných potravinách vyžadují nižší relativní vlhkost (10–18 %). Příkladem jsou zástupci rodu *Aspergillus* a *Penicillium* produkující aflatoxiny a ochratoxiny, respektive [6].

Minimální aktivita vody, při které jsou plísně schopné produkce mykotoxinů je 0,7. Mezi takovými extrémními případy mohou patřit někteří zástupci rodu *Aspergillus* nebo *Penicillium*, kteří jsou schopni růst při aktivitě vody menší než 0,75. Většina penicilií však roste při $a_w > 0,95$ a plísně rodu *Fusarium* rostou při a_w větší než 0,98 [6].

Teplota vhodná pro produkci mykotoxinů je velmi blízká optimální teplotě růstu plísně, která se ve většině případů pohybuje v rozmezí 20–30 °C. Existují však i výjimky, např. *F. graminearum*, které produkuje zearalenon při teplotě nižší, než je optimální teplota růstu [1, 4, 6].

Většina plísní potřebuje ke svému růstu kyslík. Obecně lze říci, že plísně vyžadující nejvíce kyslíku kontaminují povrch substrátu a plísně vyžadující kyslíku méně kontaminují vnitřní obsah substrátu. Nízký obsah kyslíku v atmosféře může sloužit k potlačení vzniku mykotoxinů. Snížením obsahu kyslíku na 1 % a méně, a zároveň zvýšením koncentrace oxidu uhličitého v prostředí můžeme omezit růst plísní, potažmo tvorbu mykotoxinů [6].

Mezi další faktory podmiňující rozsah kontaminace zemědělských plodin mykotoxiny patří např. rezistence rostliny vůči napadení plísní, míra stresu rostliny, virulence patogenní plísně a schopnost rostliny mykotoxiny degradovat. Další vliv na produkci mykotoxinů má délka skladování nebo míra poškození obalu zrna. Tabulka 4 shrnuje faktory podporující produkci mykotoxinů během skladování [1, 2, 4, 7].

Tabulka 4 Faktory podporující produkci mykotoxinů během skladování [1]

mykotoxiny	producent	substrát	podporující podmínky
aflatoxiny	<i>Aspergillus flavus</i>	arašídý, obiloviny, olejniný	vlhké teplo
zearalenon	<i>Fusarium</i>	kukuřice	mírné klima, opožděná sklizeň
trichotheceny	<i>Fusarium</i>	kukuřice, obiloviny	mírné klima, rychlé uskladnění
fumonisy	<i>Fusarium</i>	kukuřice	mírné klima, rychlé uskladnění
ochratoxin A	<i>Aspergillus ochraceus</i>	káva, ječmen, oves, žito	vlhkost při uskladnění

I přes dodržení zásad správné zemědělské praxe a vhodnému skladování nelze kontaminaci mykotoxiny stoprocentně předejít. V rámci technologického zpracování potravin nemusí docházet ke snížení hladin mykotoxinů. Z kontaminované suroviny se tak mykotoxiny dostávají až do finálního výrobku. Přítomnost mykotoxinů v potravinách, zejména v cereálních produktech je proto běžná [1, 2].

2.1.5. Prevence kontaminace a možnosti snížení obsahu mykotoxinů v potravinách

Mykotoxiny představují potenciální nebezpečí pro zdraví člověka, a proto je nutné předejít jejich vzniku. Prevence výskytu plísní v potravinách je založena na dodržování podmínek, které vedou k minimalizaci jejich růstu. Příkladem je ochrana potravin před vysokou vlhkostí a teplotou [4, 6].

Omezení vzniku mykotoxinů přímo na poli lze docílit aplikací fungicidů, pěstováním rezistentních druhů plodin, střídáním plodin a přizpůsobením zavlažování klimatickým podmínkám. Dalším preventivním krokem je sklizeň plodin za sucha a skladování surovin v chladném a suchém prostředí. Během skladování by měla být aktivita vody menší než 0,65, což obecně odpovídá relativní vlhkosti menší než 15 % [4, 6].

K zamezení výskytu mykotoxinů v potravinách živočišného původu je vhodné podávat hospodářským zvířatům zdravotně nezávadné krmivo [6].

V některých letech je kontaminace plísněmi nevyhnutelná kvůli klimatickým podmínkám a je nutné použít dekontaminační metody. Stejně jako neexistují stoprocentní metody prevence vzniku mykotoxinů, neexistují ani dokonalé metody jejich odstranění z kontaminovaných potravin a krmiv. Důvodem jsou jejich odlišné fyzikálně chemické vlastnosti a vysoká stabilita vůči fyzikálním, chemickým i biologickým vlivům [10, 18].

Fyzikální metody dekontaminace zahrnují teplo, mikrovlnný záhřev, gama paprsky, rentgenové a UV záření a adsorpci na sodnovápenatém aluminosilikátu. Ve vodě rozpustné mykotoxiny mohou být částečně odstraněny omytím suroviny [1, 5].

Chemicky lze odstranit např. deoxynivalenol pomocí hydrogensířčitanu sodného, chloru, chlornanu sodného, ozonu a amoniaku. Podle Creppy et al. [5] lze koncentraci aflatoxinu B1 snížit o 95–98 % pomocí amoniaku. Na druhou stranu, použití chemických metod může vést ke snížení kvality obilovin nebo vzniku nežádoucích vedlejších produktů. V tomto ohledu je nejvýhodnější použití ozonu, který v obilovinách nezanechává žádná rezidua [22].

2.1.6. Legislativa

Evropská unie stanovila maximální limity vybraných mykotoxinů v potravinách. Jedná se o deoxynivalenol, zearalenon, fumonisiny, aflatoxiny, patulin a ochratoxin A. Ke zdravotním potížím mohou ovšem přispívat i legislativně neošetřené mykotoxiny např. citrinin, moniliformin, diacetoxyscirpenol aj. Současné evropské limity obsahu mykotoxinů v ječmeni a sladu jsou uvedeny v tabulce 5 [6, 10, 16].

*Tabulka 5 Hygienické limity pro aflatoxiny, ochratoxin A, deoxynivalenol a zearalenon v ječmeni a sladu dle (ES) č. 1881/2006 [16]; *hodnota není přímo uvedena v legislativě, nicméně se mezi sladři obecně považuje za limitní*

mykotoxin	potravina	maximální limity (µg/kg)
aflatoxin B1	ječmen/slad	2
aflatoxiny Σ B1, B2, G1, G2	ječmen/slad	4
ochratoxin A	ječmen	5
	slad	3
deoxynivalenol	ječmen	1250
	slad	1250*
zearalenon	ječmen	100
	slad	100

2.2. Charakteristika vybraných mykotoxinů

2.2.1. Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou extrémně toxické látky, které mohou být produkovány třemi druhy plísně *Aspergillus* – *A. flavus*, *A. parasiticus* a *A. nomius*. Ideální podmínky pro růst těchto plísní zahrnují teploty 26–38 °C a vlhkost nad 18 %. Vyskytují se téměř na každém substrátu, zejména však na kukuřici, podzemnici, pistácích a bavlníkových semenech [5].

Aflatoxiny jsou polycyklické substituované kumariny. Celkem bylo identifikováno 20 aflatoxinů, nejvýznamnější přirozeně se vyskytující aflatoxiny jsou aflatoxin B1, B2, G1 a G2. Aflatoxiny narušují syntézu proteinů inhibicí transkripce. Vykazují hepatotoxicitu, mutagenitu, imunotoxicitu, teratogenitu a karcinogenitu. Tolerovatelný denní příjem nebyl pro aflatoxiny stanoven [6, 7].

Aflatoxin B1 (AFB1) a jeho metabolit aflatoxin M1 (AFM1)

Aflatoxin B1 je nejúčinnější hepatokarcinogen u zvířat a nejsilnější přírodní karcinogen. Nejčastěji postiženým orgánem jsou játra. Aflatoxin B1 má inhibiční účinky jak na replikaci RNA a DNA, tak na proteosyntézu. Akutní toxicita se pohybuje v rozmezí 0,3–18 mg/kg a

projevuje se jaterními nekrózami a degenerací hepatocytů. Při požití nižších dávek dochází k úbytku hmotnosti a ztrátě reprodukčních schopností [1, 4].

Aflatoxin M1 je hydroxylovaný metabolit aflatoxinu B1. AFM1 je méně toxický a méně mutagenní oproti AFB1. Může se objevit v mléce a vnitřnostech zvířat, kterým bylo podáno kontaminované krmivo. AFM1 je vázán na proteiny mléka a v sýrech je pak kvůli jeho kumulaci jeho koncentrace mnohonásobně vyšší. Pasterací se koncentrace AFM1 nesnižuje. Aflatoxin M1 je klasifikován podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC), která je součástí Světové zdravotnické organizace (WHO), jako možný karcinogen pro člověka [1, 4–6].

2.2.2. Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA), nejvíce toxický zástupce ochratoxinů, je produkován plísněmi *Penicillium verrucosum* a *Aspergillus ochraceus*. *P. verrucosum* roste při teplotách nižších než 30 °C a vyskytuje se zejména v chladnějších oblastech Evropy. *A. ochraceus* se naopak vyskytuje v tropických a subtropických oblastech. Optimální teplota pro tvorbu ochratoxinu A touto plísní se pohybuje kolem 28 °C [4–6].

Ochratoxin A se nachází především v obilovinách jako ječmen, pšenice, oves, kukuřice a rýže, dále ve vinné révě a výrobcích z ní, v kávě a luštěninách. Ze živočišných výrobků je nejvíce ohroženo uzené maso nebo výrobky obsahující vysoký podíl vnitřností a krve. V mase přežvýkavců je stupeň kontaminace nižší, jelikož mikroorganismy v bachoru hydrolyzují ochratoxin A na ochratoxin- α a fenylalanin. Ochratoxin- α se považuje za málo toxický, má však genotoxické účinky [4–6].

U zvířat byly prokázány závažné biologické účinky ochratoxinu A, především nefrotoxicita, hepatotoxicita, genotoxicita, imunotoxicita a karcinogenita. U člověka dochází k nádorům ledvin. OTA se chová jako kumulativní jed s rychlou absorpcí a pomalým vylučováním. Akutní toxicita ochratoxinu A se pohybuje v rozmezí 0,2–30,3 mg/kg tělesné hmotnosti v závislosti na živočišném druhu, pohlaví a způsobu podání. Příznaky související s akutní otravou ochratoxinem A jsou mimo jiné krvácení v mozku, játrech, ledvinách a srdci. OTA inhibuje syntézu proteinů, poškozuje metabolismus cukrů a vápníku a dále poškozuje mitochondriální funkce. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny – IARC-WHO je ochratoxin A klasifikován jako možný karcinogen. Tolerovatelný týdenní příjem (TWI) ochratoxinu A je 120 ng na kg tělesné hmotnosti [1, 2, 6, 15, 16, 50].

Molekula ochratoxinu je složena z dihydroizokumarinu a fenylalaninu. Ochratoxin A obsahuje benzenové jádro a systém konjugovaných dvojných vazeb, a tak v alkalickém prostředí pod UV světlem fluoreskuje modrou barvou, a v kyselém prostředí fluoreskuje zelenou barvou, čehož se využívá při jeho analýze [4].

OTA je rozpustný v organických rozpouštědlech (např. alkoholech, ketonech a chloroformu) a špatně rozpustný ve vodě. Jednou z předních vlastností ochratoxinu A je stabilita při vysokých teplotách (má bod tání 169 °C), to znamená, že lze toxin z potravin odstranit jen velmi omezeně [4].

Při výskytu několika mykotoxinů současně může docházet k zesílení jejich účinků, např. současný výskyt aflatoxinů a ochratoxinu A zvyšuje jejich hepatotoxické účinky a výskyt OTA s citrininem zvyšuje nefrotoxické účinky [6].

2.2.3. Fumonisin

Fumonisin jsou produkovány plísněmi rodu *Fusarium*, které napadají zejména kořeny a stébla rostlin. Nejvýznamnějším producentem je plíseň *F. moniliforme*. Nejvýznamnějšími zdroji fumonisinů jsou potraviny a krmiva obsahující kukuřici nebo rýži [4, 19].

Jsou známy desítky homologů fumonisinů, nejdůležitějšími jsou však fumonisin B₁, B₂ a B₃, které se běžně vyskytují v přírodě. Fumonisin inhibují syntézu sfingolipidů v mozku a v nervové tkáni a narušují metabolismus tuků. Podle IARC-WHO je fumonisin B₁ klasifikován jako možný karcinogen pro člověka. Tolerovatelný denní příjem (TDI) je 2 µg na kg tělesné hmotnosti pro fumonisin B₁, B₂ a B₃, samostatně nebo v kombinaci [6, 15, 16, 19].

2.2.4. Zearalenon

Zearalenon (ZON) je fenolický lakton kyseliny resorcylové. Tento mykotoxin je produkován rodem *Fusarium*. Mezi nejvýznamnější zástupce se řadí *F. graminearum* a *F. semitectum* rostoucí v chladnějších oblastech při teplotách 10–15 °C. ZON je běžným kontaminantem potravin, nachází se hlavně v kukuřici a kukuřičných výrobcích. ZON je stabilní a nemění se ani po tepelném zpracování. Vysoké koncentrace zearalenonu značí nesprávné ošetření a uskladnění [4, 6, 19].

Existuje více než 150 derivátů zearalenonu, z nichž nejdůležitější jsou α-zearalenon a β-zearalenon. α-zearalenon je až čtyřikrát více toxický než samotný zearalenon, β-zearalenon je pak přibližně stejně toxický jako zearalenon. ZON a jeho metabolity mají silné estrogení a anabolické účinky a jsou schopny ovlivnit reprodukční systém organismů [4, 19].

Zearalenon není akutně toxický, toxikózy spojené s tímto mykotoxinem jsou dány společným působením s trichotheceny, které se spolu s ním vyskytují. Předběžný tolerovatelný denní příjem (t-TDI) je u zearalenonu 0,2 µg na kg tělesné hmotnosti. Podle IARC-WHO není ZON karcinogenní pro člověka [6, 15, 16].

2.2.5. Trichotheceny

Trichotheceny jsou tricyklické seskviterpeny s šestičlenným kruhem, které tvoří více než 150 různých sloučenin. Podle chemických vlastností se rozlišuje několik skupin trichothecenů uvedených v tabulce 6. Plísně rodu *Fusarium* produkují trichotheceny typu A a B. Trichotheceny typu A, např. T-2 a HT-2 toxin, jsou více toxické ve srovnání s trichotheceny typu B, mezi které patří nejběžněji se vyskytující deoxynivalenol [2, 19].

Tabulka 6 Rozdělení trichothecenů [2]

podskupina trichothecenů	zástupce
typ A	T-2 a HT-2 toxiny, monoacetoxyscirpenol
typ B	nivalenol, deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, fusarenon-X
typ C	krotocin
typ D	verrukariny, roridiny

Zástupci rodu *Fusarium* jsou přítomni v půdě, kde rozkládají organickou hmotu. Některé druhy mohou být patogenní pro rostliny, zvířata i člověka. Vyskytují se v obilovinách, nejvíce v pšenici a kukuřici. V nejvyšších koncentracích je přítomen deoxynivalenol, který je považován za indikátor kontaminace dalšími trichotheceny [2, 6].

Trichotheceny mají antibakteriální, antivirální, fungistatické a cytostatické účinky. Jsou známy jako inhibitory proteosyntézy a imunosupresivní látky a považují se za potenciálně karcinogenní a mutagenní [2, 19].

2.2.5.1. Nivalenol

Nivalenol (NIV) je přirozeně se vyskytující mykotoxin produkováný plísněmi rodu *Fusarium*. Nivalenol je významným zástupcem trichothecenů skupiny B. Tento mykotoxin vykazuje imunotoxické a hematotoxické účinky [8].

Největší koncentrace tohoto toxinu byla zaznamenána v ovsu, kukuřici, ječmeni a pšenici a ve výrobcích z těchto obilovin. Nejvíce nivalenolu, co se týče lidské stravy, je obsaženo v chlebu a pekařských výrobcích, těstovinách, snídaňových cereáliích, sladů a pivu. Prozatímni tolerovaný denní příjem mykotoxinu je maximálně 0,7 µg/kg tělesné hmotnosti [8, 16].

2.2.5.2. Deoxynivalenol

Deoxynivalenol (DON) je celosvětově rozšířený, nejběžnější a nejznámější mykotoxin v obilovinách. Deoxynivalenol patří mezi trichotheceny typu B, je běžným kontaminantem pšenice, ječmene, kukuřice a výrobků z nich. Je produkován zejména kmeny *Fusarium graminearum* a *F. culmorum*. Optimální podmínky pro růst těchto plísní zahrnují aktivitu vody nad 0,97 a teplotu 25–28 °C [4, 5, 19].

Mezi deriváty DON patří 3-acetyl-DON, 15-acetyl-DON a deoxynivalenol-3-glukosid (D3G). Deoxynivalenol-3-glukosid, rovněž také maskovaný DON, je modifikovaná forma deoxynivalenolu v rostlinách. Maskované mykotoxiny jsou deriváty mykotoxinů vzniklé konjugací s další komplexní molekulou, např. cukrem, aminokyselinou nebo sulfátovou skupinou různých sloučenin [19].

Deoxynivalenol je v rámci trichothecenů nejméně toxický, jeho koncentrace v obilovinách jsou však z daných mykotoxinů nejvyšší. Příznaky intoxikace tímto mykotoxinem jsou zvracení, bolest břicha a průjem. TDI je pro deoxynivalenol stanovena na 1 µg na kg tělesné hmotnosti [16, 19].

2.2.5.3. T-2 a HT-2 toxiny

T-2 a HT-2 toxiny patří mezi trichotheceny typu A. Jsou produkovány rodem *Fusarium*, například *F. sporotrichioides*, *F. poae* a *F. langsethiae*. Toxiny mohou být produkovány v širokém rozmezí teplot od -2 °C do 35 °C při aktivitě vody vyšší než 0,88. Nejčastěji jsou tyto mykotoxiny přítomny v obilovinách jako oves, ječmen a pšenice [4, 5].

T-2 toxin je cytotoxin s imunosupresivními účinky, způsobuje akutní intoxikace i chronické nemoci u zvířat a lidí. Příznaky intoxikace jsou ospalost, třas, bolesti břicha a ztráta hmotnosti. Akutní i chronická toxicita je vyšší ve srovnání s deoxynivalenolem. T-2 toxin inhibuje syntézu proteinů, RNA i DNA a způsobuje peroxidaci lipidů, která vede k narušení buněčných membrán. T-2 toxin je nejvíce toxický trichothecen a podle IARC-WHO se nepovažuje za karcinogen [14, 15, 19].

T-2 toxin je po strávení metabolizován na HT-2 toxin, což je jeho deacetylovaný metabolit. HT-2 toxin má podobné účinky jako jeho prekurzor. Kombinovaný prozatímní tolerovatelný denní příjem je pro T-2 a HT-2 toxin 0,06 µg na kg tělesné hmotnosti [4, 16].

2.3. Mykotoxiny v pivovarnictví

Pivovarnictví se v České republice řadí mezi významné obory potravinářského průmyslu a má mnohaletou tradici. V České republice se ročně vyrobí asi 20,5 milionu hektolitrů piva a vypije se ho 15,9 milionu hektolitrů. V roce 2016 bylo v ČR 398 aktivních pivovarů. Vyrábí se piva světlá, tmavá, výčepní, ležáky a speciály nebo piva se sníženým obsahem alkoholu. Technologie výroby se skládá ze tří hlavních úseků – přípravy mladiny, kvašení mladiny a závěrečných úprav piva [21, 26].

Ačkoli se konzumace piva v ČR pomalu snižuje, průměrný Čech ročně vypije 143 litrů piva, což je nejvíce v celé Evropě. Nepřiměřená konzumace piva však může vést ke zvýšené expozici mykotoxinů [21, 22].

Mykotoxiny se do piva mohou dostávat z kontaminovaných surovin – některé mykotoxiny přechází z ječmene do sladu a poté do piva kvůli jejich vysoké termostabilitě (aflatoxiny, zearalenon a deoxynivalenol) nebo rozpustnosti ve vodě (deoxynivalenol a fumonisiny) [18].

Nejčastěji se vyskytující mykotoxiny v pivě jsou trichotheceny typu B (deoxynivalenol a jeho maskovaná forma deoxynivalenol-3-glukosid) a fumonisiny, produkované plísněmi rodu *Fusarium*. Nejvíce se studie zabývající se obsahem mykotoxinů v pivech zaměřují na deoxynivalenol, který je v pivech jednak nejvíce rozšířený, jednak obsažen v nejvyšší koncentraci. Deoxynivalenol a jeho glykosid se nejvíce vyskytují v evropských pivech, oproti tomu fumonisiny jsou častější v pivech z Afriky. Například studie [24] zaměřená na rakouská a německá piva uvedla, že D3G je obsažen v 93 % vzorcích piv a DON v 77 % vzorcích. V evropských pivech se také objevuje ochratoxin A. Obsah vysoce toxických aflatoxinů je pozorován v Asii a Africe. Zearalenon, T-2 a HT-2 toxiny jsou v pivech zastoupeny v menší míře [12, 49].

2.4. Mykotoxiny v pivovarských surovinách

Pro výrobu piva jsou zapotřebí čtyři hlavní komodity – slad, chmel, voda a kvasinky. Kvalita vstupních surovin hraje významnou roli ve tvorbě organoleptických vlastností piva, stejně tak jako v obsahu mikroorganismů, potažmo mykotoxinů. Při výrobě piva může být koncentrace mykotoxinů pozměněna díky některým fyzikálním, chemickým a biochemickým procesům [17].

Celkový obsah mykotoxinů se v ječmeni, ve sladu a v pivě značně liší. Jejich koncentrace se pohybuje v rozmezí jednotek až stovek $\mu\text{g/kg}$ suroviny v závislosti na klimatických podmínkách, způsobu skladování a dalších faktorech uvedených v kapitole 2.1.4 a dále v textu [14, 17, 20].

2.4.1. Ječmen

Na klasech ječmene, jakožto hlavní suroviny pro výrobu sladu, se vyskytuje široké spektrum fytopatogenních hub. Na povrchu zrna se tyto mikroorganismy vyskytují nejen během pěstování plodiny, ale i po celou dobu skladování, a i v průběhu výroby sladu [13].

Fuzariózy obilnin (FHB – *Fusarium Head Blight*) jsou onemocnění rostlin způsobená plísněmi, která představují problém nejen pro zemědělce, ale i pro sladaře, protože způsobují změny ve kvalitě ječmene, dochází ke zhoršení výtěžnosti sladu a navíc jsou většinou spojeny s výskytem mykotoxinů. Fuzariózy obilnin v Evropě způsobují zejména druhy *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* a *F. culmorum* aj. [12, 18, 23].

Dalším problémem výskytu fusárií v pivovarských surovinách je skutečnost, že tyto houby způsobují gushing neboli přepěňování piva. Dalšími možnými činiteli tohoto jevu mohou být plísně rodu *Aspergillus*, *Rhizopus* a *Penicillium*. Fusaria dále snižují klíčivost ječmene, způsobují změny barev a vznik přípachů v pivu. Snížená klíčivost je problémová kvůli snížené tvorbě enzymů. Naopak může docházet k produkci proteáz plísněmi, což může ovlivňovat barvu, chuť, texturu a pěnivost piva [17, 22].

Hlavními mykotoxiny ve sladovnickém ječmeni jsou již zmíněné fusariové mykotoxiny. V ječmeni je nejvíce zastoupen deoxynivalenol, dále pak zearalenon, nivalenol, T-2 a HT-2 toxin. Koncentrace a typ mykotoxinu kontaminující ječmen závisí na lokalitě, klimatu, a dalších faktorech, které jsou uvedeny v kapitole 2.1.4. [12, 18]. Důkazem může být srovnání dvou studií – zearalenon se v ječmeni z Brazílie, kde je tropické klima, v rámci studie [47] vyskytoval v 86 % vzorcích nad $100 \mu\text{g/kg}$. Oproti tomu ječmen z ČR, jak uvádí Běláková et al. [48] obsahoval ZON pouze v 18 % případů, a to v průměrné koncentraci $2,4 \mu\text{g/kg}$.

2.4.2. Chmel

Chmel přidávaný při chmelovaru může být taktéž kontaminován fusariovými mykotoxiny. Množství přidávaného chmele je však oproti sladu malé a podíl na celkové hladině mykotoxinů v pivě je tím pádem zanedbatelný [25].

2.4.3. Slad

Základní surovinou pro výrobu sladu je ječmen jarní. Vytříděný a vyčištěný ječmen se nejprve máčí, kdy dochází k absorpci vody potřebné ke klíčení. Máčení se skládá z namáčení zrn ve vodě a ze střídajících se vzdušných přestávek, kdy se zrno provzdušňuje. Dalším krokem výroby sladu je klíčení. Cílem tohoto procesu je aktivace a syntéza enzymů a rozluštění zrna. Během klíčení se tvoří amylázy, proteázy, cytázy a fosfatázy. Dochází ke štěpení vysokomolekulárních látek za vzniku nízkomolekulárních, které pak mohou být využity při kvašení. Během hvozdní se postupně snižuje obsah vody v zrnech a redukuje se enzymatická aktivita. Vznikají aromatické a barevné látky, které jsou charakteristické pro daný slad a podílejí se na výsledných vlastnostech piva [17, 26].

Při sladování vznikají vhodné podmínky pro růst mikroorganismů, jejich množství roste během celého máčení a klíčení. Výměnou máčecí vody lze část mikroorganismů odstranit, jejich počet však dosahuje vrcholu až během klíčení. Při hvozdní dochází k poklesu mikroflóry, ne však k jejímu vymizení. Četnost mikroorganismů je často vyšší u sladu než u sklizeného ječmene [13].

2.4.3.1. Deoxynivalenol

Deoxynivalenol spolu se zearalenonem patří k nejčastějším kontaminantům ječmene. Chování deoxynivalenolu je v rámci sladařské technologie dobře zdokumentováno. Koncentrace deoxynivalenolu se během máčení snižuje, část DON během máčení přechází do vody a je odplavena. Producenti mykotoxinu, fusaria, se ovšem neničí a jsou nadále schopni produkovat mykotoxiny při klíčení a na začátku hvozdní. Z tohoto důvodu není efektivní odstraňovat DON přímo z ječmene [22, 23].

V následujícím kroku klíčení sladu dochází k novému navýšení hladin deoxynivalenolu ve srovnání s původní koncentrací DON v ječmeni. V zeleném sladu jsou hladiny deoxynivalenolu o 40 % až 50 % vyšší než v ječmeni po třetím dni máčení kvůli růstu plísní a produkci mykotoxinů *de novo*. Dalším vysvětlením může být prudké zvýšení enzymatické aktivity v ječných zrnech, hydrolýza maskovaných mykotoxinů a jiných metabolitů a následné uvolnění volných forem mykotoxinů z různých makromolekul [14].

Při hvozdní se koncentrace deoxynivalenolu nesnižuje, jelikož je DON tepelně stálý [11, 23]. Podle některých studií [22, 23] se však může koncentrace DON mírně zvýšit kvůli ideálním podmínkám pro růst plísní na začátku hvozdní.

Ve výsledku obsahuje slad přibližně 50 % množství deoxynivalenolu a asi dvojnásobné množství deoxynivalenol-3-glukosidu ve srovnání s jejich koncentrací v nezpracovaném ječmeni [9, 14].

Odkličováním se získávají kořínky (sladový květ) ceněné jako krmivo nebo jako součást zvláštní výživy. Kořínky však obsahují nejvíce mykotoxinů ze všech ostatních meziproduktů sladování. Použití sladového květu k lidské výživě či ke krmným účelům tak vyžaduje zvýšenou pozornost [11].

2.4.3.2. Deoxynivalenol-3-glukosid

Deoxynivalenol-3-glukosid je nejběžnější modifikovaná forma deoxynivalenolu. Stejně tak jako u ostatních mykotoxinů, i výskyt D3G je dán zejména klimatickými podmínkami. To potvrzuje studie [14], která uvádí, že v roce 2009 byl D3G přítomen v 90 % vzorcích sladu, kdežto v roce 2010 byl přítomen jen ve 25 % vzorcích.

V rámci sladování dochází k výrazným změnám v koncentraci deoxynivalenol-3-glukosidu. Ačkoliv během máčení dochází k odplavení velké části deoxynivalenolu, koncentrace jeho maskované formy nepatrně vzrůstá. Možnou příčinou tohoto jevu je uvolnění D3G z polysacharidů [11].

Mezi deoxynivalenolem a deoxynivalenol-3-glukosidem existuje blízký vztah – při klíčení dochází k převedení zhruba 50 % DON na jeho glykosid. To může být způsobeno zvýšenou hladinou glukózy a aktivací enzymů potřebných ke glykosylaci (glykosyltransferáz). Deoxynivalenol-3-glukosid je také uvolněn z vyšších glykosidů a nerozpustných polysacharidových nebo bílkovinných komplexů. Před koncem klíčení však dochází ke snížení koncentrací obou mykotoxinů [9, 14, 23].

Stejně jako u deoxynivalenolu nedochází během hvozďení k poklesu množství přítomného deoxynivalenol-3-glukosidu. Podle studie [23] se koncentrace D3G při hvozďení dokonce zvyšuje.

V rámci studií [9, 14, 23] došlo během výroby sladu k celkovému snížení koncentrace deoxynivalenolu a zvýšení hladiny deoxynivalenol-3-glukosidu. To ovšem nemusí platit vždy, jelikož je koncentrace mykotoxinů závislá na klimatických podmínkách daného roku, odrůdě ječmene, konkrétní plísni apod.

2.4.3.3. Zearalenon

O změnách koncentrace zearalenonu během sladování jsou zatím známy pouze sporné informace. Této problematice se věnuje jen několik málo studií, jejichž výsledky se navíc rozcházejí. Podle Wolf-Hall et al. [22] se koncentrace ZON při máčení nemění, jiná studie Pascari et al. [23] ovšem ukazuje snížení hladiny zearalenonu o 40 %. Naopak Piacentini et al. [28] uvádí, že dochází ke zvýšení hladiny mykotoxinu mezi prvním dnem máčení a druhým dnem klíčení o 173 %. Nicméně při porovnání koncentrace zearalenonu v ječmeni a ve sladu došlo k signifikantnímu snížení jeho koncentrace.

Na počátku klíčení se množství zearalenonu podle Pascari et al. [23] zvyšuje, po zhruba dvou dnech však začíná koncentrace klesat. Během hvozďení se hladina zearalenonu ve srovnání s hladinou mykotoxinu v použitém ječmeni zvyšuje. Rozdílné výsledky ukazuje článek [28], podle kterého dochází ke zvýšení hladiny mykotoxinu během klíčení a snížení hladiny při hvozďení.

Všechny uvedené studie se však shodují na tom, že se hladiny zearalenonu v průběhu sladování značně snižují.

2.4.3.4. T-2 a HT-2 toxin

T-2 a HT-2 toxiny se nejčastěji vyskytují v ovsu a ovesných výrobcích, v poslední dekádě je však jejich výskyt zaznamenán i v ječmeni a pšenici. Průměrný obsah obou mykotoxinů se v ječmeni pohybuje kolem 50–200 µg/kg [14].

O vlivu sladování a vaření piva na tyto toxiny jsou zatím známy jen sporné informace. Například studie [14] uvádí, že při máčení dochází k poklesu hladin HT-2 i T-2 toxinu a při klíčení dochází k dalšímu poklesu do takové míry, že v dalších krocích sladařské technologie už T-2 toxin není detekovatelný vůbec a HT-2 toxin je přítomen pouze v nepatrném množství. Naproti tomu studie [11] poukazuje na zvýšení hladiny HT-2 toxinu během klíčení a další zvýšení na začátku hvozdní. V rámci této studie bylo ve výsledném sladu mykotoxinu více než na začátku sladování.

2.5. Změna koncentrace mykotoxinů v průběhu výroby piva

Výroba piva se skládá z několika fází – výroby mladiny ze sladu, vody a chmele; kvašení mladiny, zrání mladého piva a konečných úprav před stáčením [17, 26].

Prvním krokem výroby piva je šrotování, kdy se rozemele vyčištěný slad. Následuje vystírání, při němž se smíchá voda se šrotem s cílem získat co nejvíce rozpustných látek ze sladu. Množství extrahovaných látek ovlivňuje další fáze výroby mladiny a vlastnosti piva. Následným rmutováním dochází k další extrakci látek sladu a k enzymatickému štěpení škrobu a bílkovin. Při dekokčním rmutování, které je v České republice nejvíce uplatňováno, se postupně vystírka ohřívá na teploty odpovídající teplotnímu optimu fosfatáz, proteáz a amyláz [17, 26].

V následujícím kroku scezování se odděluje mláto od sladiny. Sladina se dále vaří s chmelem, dochází k inaktivaci enzymů, tvorbě produktů Maillardovy reakce, izomeraci hořkých látek chmele a oxidaci polyfenolů. Vzniklá mladina se ochladí a nechá se kvasit. Používají se různé kmeny *Saccharomyces cerevisiae*. Mladé pivo následně zraje, vznikají senzoricky aktivní látky, pivo se číří a sytí oxidem uhličitým.

Z pivovarských surovin se mohou během vaření piva uvolňovat mykotoxiny do finálního výrobku. Osud nejvýznamnějších mykotoxinů v rámci této technologie je shrnut v následujícím textu [17, 26].

2.5.1. Deoxynivalenol a deoxynivalenol-3-glukosid

Deoxynivalenol je nejčastějším kontaminantem piva z řady mykotoxinů. V rozsáhlé studii [24], ve které bylo analyzováno 374 piv ze 38 zemí světa, stanovili průměrnou koncentraci DON 8,4 µg/l a D3G 6,9 µg/l. Tyto výsledky korespondují s další studií [31], kde byla koncentrace DON stanovena na 6,6 µg/l a D3G na 8,5 µg/l. Uvedené hodnoty nejsou nijak alarmující a pro běžného konzumenta nepředstavují zdravotní riziko [27].

Deoxynivalenol je v průběhu vaření piva stabilní a dostává se až do konečného výrobku. Během rmutování se koncentrace DON i jeho glykosidu může zvýšit oproti původním hladinám detekovaných ve sladu, kvůli uvolnění toxinu z konjugovaných bílkovin působením proteáz [22].

Celkem vzato, ze sladu přechází do piva zhruba 70–90 % deoxynivalenolu a jeho glykosidu. Oproti původní hladině DON ve sladu je v mladém pivu i v konečném výrobku deoxynivalenolu méně. Naopak hladina D3G postupně narůstá od sladiny až po mladé pivo. Mezi hlavní příčiny může patřit enzymatická aktivita glykosyltransferáz a jiných enzymů indukovaná během rmutování. Při rmutování dochází k rozrušení škrobových zrn, membránově vázaných proteinů a k rozkladu dextrinů na monosacharidy, tím pádem může dojít k uvolnění D3G z těchto forem [11, 30].

Nealkoholická piva vykazují nižší stupeň kontaminace DON oproti pivům s vyšším obsahem alkoholu. Varga et al. [24] například uvádí, že pouze 26 % vzorků nealkoholických piv (z celkových 19 vzorků) bylo kontaminováno deoxynivalenolem. U alkoholických piv analyzovaných v této studii obsahovalo DON 77 % z nich. Důvodem může být jiný technologický postup při výrobě nealkoholického piva, např. použití nižší koncentrace mladiny, kratší fermentace nebo použití jiného kmene kvasinek [24, 31].

2.5.2. T-2 a HT-2 toxin

O osudu T-2 a HT-2 toxinů je v rámci pivovarské technologie známo jen málo informací, které jsou navíc sporné. Tyto toxiny totiž nebývají v pivě příliš často analyzovány [14].

V případě kontaminace mladiny T-2 toxinem dochází ke snížení rychlosti růstu kvasinek a utilizace kyslíku, s následkem výrazného zpomalení kvašení [18, 22]. Podle [22] však mohou některé druhy kvasinek detoxikovat T-2 toxin, což by bylo výhodné při použití kontaminovaných obilovin.

Podle článku Lancové et al. [11] nedochází v rámci výroby piva ke změnám v koncentraci HT-2 toxinu, případně dochází v jednotlivých krocích výroby piva k nepatrnému snižování koncentrace HT-2 toxinu podle studie [14].

2.5.3. Ochratoxin A

Výskyt ochratoxinu A v pivě indikuje nevhodné skladovací podmínky ječmene, jelikož producent OTA, *Penicillium verrucosum*, je hlavním kontaminantem skladovaných obilovin. Při skladování sladovnického ječmene za vhodných podmínek se ochratoxin A v tomto ječmeni nevyskytuje. Slady obecně obsahují méně než 0,5 µg/kg OTA [44].

V rámci pivovarské technologie dochází ke snížení množství ochratoxinu A až o 40 % při rmutování. Tento jev může být způsoben degradací OTA proteolytickými enzymy. Rozštěpením peptidové vazby ochratoxinu A vzniká netoxický ochratoxin α. Část ochratoxinu A, u které ke štěpení nedošlo, se může dostávat do mláta, protože OTA není příliš rozpustný ve vodě. Podle [44] v mlátě zůstává 16 % OTA. Při použití kontaminovaného sladu tak mláto není z hlediska kontaminace ochratoxinem A vhodné pro krmné účely [20, 44].

Ochratoxin A je stabilní i při vysokých teplotách, takže při chmelovaru nedochází ke snížení jeho koncentrace. V rámci fermentace dochází při použití kontaminovaného sladu k jejímu zpomalení, ale množství vyprodukovaného ethanolu zůstává nezměněno. Vysoká koncentrace OTA taktéž nemá žádné účinky na životaschopnost kvasinek. Během fermentace dochází k mírnému snížení množství OTA, kdy se určitý podíl adsorbuje na povrch kvasinek. Do piva ze sladu přechází 13–32 % ochratoxinu A [20, 44].

V letech 2011–2014 bylo analyzováno 132 českých piv. Ochratoxin A byl nalezen u 81 % analyzovaných vzorků. Jeho průměrná koncentrace v nealkoholických pivech byla 9,0 ng/l, výčepních pivech 28,9 ng/l, ležácích 29,2 ng/l a ve speciálních pivech 16,9 ng/l [20].

Zajímavé srovnání ukazuje článek [51], který porovnává koncentraci ochratoxinu A v konvenčně vyráběných a organických belgických pivech před a po zavedení legislativního limitu. Maximální povolené limity OTA v potravinách v Evropské unii byly stanoveny Nařízením komise (ES) č. 466/2001 stanovujícím maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Maximální limit pro výskyt OTA je v ječmeni 5,0 µg/kg a ve sladu 3,0 µg/kg. Ochratoxin A se v rámci studie vyskytoval před zavedením limitu ve všech organických pivech v rozmezí 18–1134 ng/l. V konvenčních pivech byl ochratoxin A nalezen v 78 % vzorků a jeho koncentrace se pohybovala od 19 do 198 ng/l. Po zavedení legislativního limitu bylo v konvenčně vyráběných pivech 3–67 ng/l OTA a v organických pivech 19–158 ng/l ochratoxinu A [51, 52].

2.5.4. Zearalenon

Zearalenon je během kvašení piva metabolizován kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae* na α - a β -zearalenol. Kromě toho, většina zearalenonu přechází do mláta a v pivě se nevyskytuje [11, 22].

2.6. Možnosti stanovení mykotoxinů v pivovarských surovinách a pivě

Mykotoxiny se ve sladu a v pivě vyskytují ve velmi nízkých koncentracích, a proto jsou pro jejich detekci potřebné citlivé a spolehlivé analytické postupy. V současnosti existuje mnoho postupů schopných přesné identifikace a kvantifikace mykotoxinů. Pro kontrolu pivovarských surovin a samotného piva se nejčastěji používají metody založené na kapalinové chromatografii ve spojení s hmotnostní spektrometrií [36, 37].

Obecně lze metody stanovení mykotoxinů rozdělit na metody, pomocí kterých lze simultánně stanovit široké spektrum mykotoxinů v jednom vzorku a na metody zaměřené na jediný analyt. Výhodou metod zaměřených na více analytů je jednoduchá příprava vzorku a extrakce bez následného přečištění. Nevýhodou je interference dalších látek v extraktu, tím pádem snížená citlivost těchto metod. Naproti tomu metody, jimiž lze stanovit jen jeden mykotoxin, vyžadují složitější úpravu vzorku. Výsledkem je vyšší citlivost, vysoké rozlišení, nižší meze detekce a minimalizace matričních efektů, které ovlivňují analytickou metodu [35, 36, 46].

Screeningové metody jako například TLC, ELISA, biosenzory a FT-IR umožňují rychlé, jednoduché a opakovatelné stanovení obsahu mykotoxinů s dostatečnou citlivostí. Možné je i

stanovení více mykotoxinů najednou. Nevýhodou těchto metod může být nízká specifita a interakce konjugovaných metabolitů [4, 36].

Vývoj rychlých a jednoduchých screeningových analytických metod pro stanovení mykotoxinů v pивě je limitován řadou faktorů – zejména velmi nízkými hladinami mykotoxinů v komplexní matici. ELISA představuje jednoduchou a v některých případech levnou možnost analýzy. Problémem je však nutnost potvrdit získané výsledky složitějšími technikami jako například GC-MS nebo LC-MS, protože ELISA kity zatím nenabízí dostatečnou přesnost [53].

Optické metody FT-IR/ATR a NIR slouží pro rychlé a nedestruktivní stanovení mykotoxinů v obilovinách. Tyto techniky nevyžadují téměř žádnou úpravu vzorku, na druhou stranu výsledky měření jsou silně závislé na matici [54].

Konfirmační a kvantitativní techniky, které již mají dostatečnou selektivitu a nízké detekční limity jsou například vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s UV, PDA, FLR nebo MS detekcí a plynová chromatografie s ECD, FID nebo MS detektorem. Uvedené instrumentální techniky jsou však nákladné, stanovení je časově náročné a vyžaduje zkušené operátory. Nicméně, prozatím představují nejpreciznější techniky pro stanovení mykotoxinů v pivech a pivovarských surovinách [36, 53].

Jelikož se často synergicky vyskytuje více mykotoxinů, v posledních letech se rozvíjí metody použitelné pro detekci několika mykotoxinů zároveň. Základní technikou těchto analýz je LC-MS/MS. Ačkoliv hmotnostní spektrometrie nabízí dostatečnou selektivitu a umožňuje stanovit více analytů v jedné analýze, realizace této techniky na poli mykotoxinů je omezena řadou faktorů. Mykotoxiny mají velmi různou chemickou strukturu, a proto je výběr extrakčního činidla, mobilní fáze a podmínek analýzy limitován řadou kompromisů [54].

Analytické postupy používané pro stanovení mykotoxinů v pивě se výrazně neliší od metod používaných pro obiloviny. Na jednu stranu analýza piva představuje jisté výhody oproti obilovinám, protože jsou mykotoxiny v pивě distribuovány homogenně, a navíc jsou v kapalně fázi. Na druhou stranu je pivo komplexní matrice obsahující celou řadu látek s rozdílnými strukturami a může dojít k nežádoucím matričním efektům. Srovnání vybraných metod používaných pro stanovení deoxynivalenolu v pивě je uvedeno v tabulce 7 [53].

Tabulka 7 Srovnání některých instrumentálních metod používaných pro stanovení DON v pивě (X – neuvedeno)

zdroj	Metoda	přečištění	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)	výtěžnost (%)
[58]	GC-MS	SPE	0,5	1,5	92
[62]	HPLC-UV	IAC	6	7	90–105
[59]	HPLC-UV	SPE	125	625	X
[45]	UHPLC-MS/MS	SPE+QUECHERS	X	5	94
[57]	UHPLC-HRMS	LLP	X	3	93–104
[60]	HPLC-HRMS	SPE	16–20	48–60	78–97
[56]	LC-MS/MS	IAC	X	1	X
[11]	LC-MS/MS	SPE	1	5	78–117
[24]	LC-MS/MS	minimální	2,2	5,4	88
[31]	LC-MS/MS	minimální	X	2,5	84

Z tabulky 7 je patrné, že GC-MS dosahuje podobných výsledků jako kapalinová chromatografie, nicméně z důvodů uvedených dále v textu se již v dnešní době příliš nepoužívá. Spojení IAC-HPLC-UV dosahuje mnohem lepších výsledků oproti SPE-HPLC-UV. Ve studii [59] byl vzorek v rámci přečištění přefiltrován přes křemelinu a aktivní uhlí. Výsledná mez detekce 625 µg/l DON nemůže být použita pro stanovení mykotoxinu v pивě, kde se koncentrace pohybují přibližně v rozmezí 2–44 µg/l [63]. Meze detekce a kvantifikace u kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí se napříč vědeckými pracemi příliš neliší a dosahuje se výborných výsledků [53].

Analýza mykotoxinů v ječmeni, sladu a pивě může být obecně rozdělena na několik částí popsanych v následujících odstavcích. Stanovení mykotoxinů zahrnuje úpravu vzorku, extrakci mykotoxinů vhodným rozpouštědlem, přečištění extraktu, identifikaci a kvantifikaci. Každý z těchto kroků rozhoduje o výsledku analýzy [4].

2.6.1. Vzorkování

Vzorkování je jedna z nejkritičtějších částí stanovení mykotoxinů. Matrice jako ječmen nebo slad, rovněž i distribuce mykotoxinů v nich, jsou většinou nehomogenní. To je dáno zejména tím, že se mikroskopické vláknité houby běžně vyskytují v ložiscích nebaleného nebo sypkého materiálu, případně na jednotlivých zrnech. Obzvláště se takto vyskytují mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Aspergillus*. Proto se vzorky nejprve homogenizují, aby se předešlo falešným výsledkům. Neméně důležitý je také plán metody volby a odběru vzorku [4, 10, 36, 54].

Homogenní výskyt mykotoxinů lze předpokládat například u filtrovaného pивa bez kvasničného kalu, které bylo vyrobeno z primárně kontaminovaných surovin a při jeho výrobě došlo k homogenizaci [10].

2.6.2. Extrakce

Extrakce je dělicí technika, kdy se mykotoxiny oddělí od ječmene nebo sladu a přechází do rozpouštědla. Zvolený typ extrakce závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech daného mykotoxinu, na matici a na vhodnosti rozpouštědla pro následující kroky analýzy. Vybrané extrakční činidlo by mělo být selektivní, bezpečné, šetrné k životnímu prostředí a cenově dostupné [36, 37].

K uvolnění mykotoxinů z matrice lze použít mimo jiné extrakci pevná látka-kapalina, superkritickou fluidní extrakci, mikrovlnně asistovanou extrakci a extrakci za zvýšeného tlaku. Nejčastěji používaná extrakční činidla jsou methanol, směs acetonitrilu s vodou, směs ethylacetátu a acetonitrilu s vodou nebo zředěnou kyselinou, např. kyselinou mravenčí nebo octovou. Přídavek vody zvyšuje účinnost extrakce, protože voda zvýší prostupnost solventu dovnitř matrice, zatímco přídavek zředěné kyseliny narušuje vazby matrice. K vyextrahování mykotoxinů z ječmene nebo sladu se nejčastěji používá směs acetonitrilu s vodou, příp. methanolu s vodou. V případě pивa se extrakční krok vynechává [4, 31, 36, 37].

2.6.3. Přechištění

Přechištěním vzorku se z extraktu odstraní látka, které by mohly ovlivnit detekci analytu. Přechišťovací metody používané při analýzách pivovarských surovin a piva můžeme podle jejich principu rozdělit na imunoafinitní chromatografii a extrakci na pevné fázi [10].

Imunoafinitní chromatografie je jednoduchá, robustní metoda použitelná pro široké spektrum mykotoxinů, při které se pomalu překapává extrakt mykotoxinu přes imunoafinitní kolonku. V kolonce se reversibilně naváže mykotoxin z extraktu na protilátku navázanou na pevnou fázi kolonky. Následuje promytí kolonky puřem a desorpce mykotoxinu eluční směsí, která způsobuje denaturaci protilátek. Výhodou této metody je vysoká specifita, menší časová náročnost a malá spotřeba organických rozpouštědel. Nevýhodou je snížení specifity u derivátů mykotoxinů, které jsou navázány v matici. Imunoafinitní kolonky jsou určeny pouze pro jeden mykotoxin, případně skupinu mykotoxinů s podobnými vlastnostmi, tím pádem je při stanovení více mykotoxinů potřeba několik extrakcí a vzrůstá finanční i časová náročnost metody [36, 37].

Principem extrakce na pevné fázi (SPE) je rozdělení analytu a interferujících látek mezi mobilní a stacionární fázi. SPE se využívá k odstranění matrice. Po kondicionaci kolonky a následném nanesení vzorku se kolonka promývá a mykotoxin je eluován organickým rozpouštědlem. Přechištění pomocí SPE lze použít při stanovení aflatoxinů, zearalenonu, deoxynivalenolu, T-2 a HT-2 toxinu, nivalenolu a patulinu [37].

2.6.4. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická technika určená k separaci směsi látek na základě jejich rozdělení mezi plynnou mobilní fázi a pevnou nebo kapalnou stacionární fázi. Plynová chromatografie, stejně tak jako LC, umožňuje simultánní analýzu více mykotoxinů. Vykazuje vysoké rozlišení, citlivost, přesnost a rychlost. V minulosti se pro stanovení mykotoxinů v pivech, zejména pak trichothecenů, využívala zejména plynová chromatografie s ECD, FID nebo MS detektory. Nevýhodou techniky byla nutná derivatizace netěkavých sloučenin, například deoxynivalenolu. Navíc bylo nutné rozsáhlé přechištění vzorků, aby nedocházelo k interakci látek z matrice s derivatizačním činidlem. V současnosti se místo GC používá kapalinová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií [4, 53].

2.6.5. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je analytická technika, která slouží k separaci, identifikaci a kvantifikaci analytu ve vzorku. Princip metody je založen na opakované tvorbě rovnovážných stavů analytu mezi dvěma fázemi – mobilní a stacionární. Stacionární fáze je umístěna v koloně, mobilní fáze je pohyblivá a unáší vzorek chromatografickou kolonou. Analyt interaguje s mobilní i stacionární fází, což má za následek postupné rozdělení jednotlivých látek ve vzorku. Základními typy separačních mechanismů jsou adsorpce, rozdělování, výměna iontů, síťový efekt a afinita analytu ke stacionární fázi [41, 42].

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie představuje v dnešní době nejčastěji používanou techniku ke stanovení mykotoxinů, oplývá vysokou citlivostí, dostatečnou selektivitou a

opakovatelností. Na rozdíl od plynové chromatografie není potřeba derivatizace. Mezi nejvíce používané detektory patří UV, PDA, FLR a MS [4, 36].

Pomocí HPLC-UV lze stanovit pouze jeden mykotoxin, případně skupiny strukturně podobných mykotoxinů. Další zřejmě největší nevýhodou samotné HPLC-UV je vysoký matriční efekt. Matriční efekty zhoršují citlivost snížením analytického signálu a lze je částečně potlačit purifikací extraktu nebo použitím vnitřních standardů. Z tohoto důvodu je u této techniky vyžadováno přečištění, např. pomocí imunoafinitních kolonek. Limity kvantifikace pro IAC-HPLC-UV jsou u deoxynivalenolu většinou pod 10 µg/l [10, 53].

Aflatoxiny, ochratoxiny a citrinin obsahují ve svých strukturách konjugovaný systém dvojných vazeb umožňující jejich kvalitativní i kvantitativní stanovení fluorimetricky. U ostatních mykotoxinů není tato metoda rozšířená, protože je zapotřebí derivatizace. Použití fluorescenčního detektoru se vyznačuje vysokou citlivostí, vždy je však nutné provést přečištění vzorku [37].

U kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí nejdříve dochází k rozdělení jednotlivých látek vzorku kapalinovou chromatografií, poté jsou tyto látky ionizovány, rozděleny a identifikovány podle jejich poměru hmotnosti a náboje. Teoreticky je možné využít ke stanovení mykotoxinů všechny MS analyzátory, v praxi se však nejvíce využívají trojitý kvadrupól, iontová past a analyzátor doby letu [37].

HPLC-MS je univerzální metodou stanovení mykotoxinů v pivovarských surovinách a pivu. Ve srovnání s HPLC-UV nebo FLR nabízí HPLC-MS vyšší selektivitu, jednoznačné potvrzení molekulární podstaty analytu a možnost využití izotopově značených vnitřních standardů. Další výhodou je možnost pozorování molekulárních struktur různých derivátů mykotoxinů, například maskovaných mykotoxinů. Technika HPLC-MS je rychlá, efektivní a přesná [54].

Spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí umožňuje nejen vysoce specifické a přesné výsledky, ale i stanovení několika mykotoxinů najednou v rámci jedné analýzy. Sulyok et al. [35] dokázal ve své studii stanovit až 87 mykotoxinů pomocí této techniky. Nevýhodou jsou však vysoké pořizovací náklady [4, 35, 36].

2.6.6. Ultra účinná kapalinová chromatografie

Ultra účinná kapalinová chromatografie (UPLC) je stejně tak jako vysokoúčinná kapalinová chromatografie založena na rozdělení látek mezi stacionární a mobilní fázi. Rozdíly mezi oběma metodami jsou zejména v rozměrech částic a velikosti tlaku. Použitím částic menších než 2 µm dochází u UPLC ke zvýšení rychlosti separace. UPLC využívá nižší průtok mobilní fáze a umožňuje vyšší citlivost, účinnost a rozlišení oproti HPLC. Hardware UPLC, stejně tak jako speciálně vyvinuté částice náplně kolony, je uzpůsoben vysokému tlaku, který dosahuje hodnot až 103 MPa [43].

2.6.7. ELISA

Nejrozšířenější imunochemickou metodou v analýze mykotoxinů je ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Imunochemické metody jsou založeny na interakci antigenu (mykotoxinu) a protilátky. Protilátka se využívá k identifikaci a kvantifikaci daného antigenu.

ELISA využívá značení protilátek enzymy, které mění daný chromogenní substrát na barevný produkt. Enzymy určené ke značení musí mít vysokou specifickou aktivitu, aby byl produkt reakce detekovatelný i v nízkých koncentracích a musí tvořit kovalentní vazbu s antigenem nebo protilátkou bez razantních změn v jejich aktivitě. Mezi nejčastěji používané enzymy patří alkalická fosfatáza, křenová peroxidáza a β -galaktosidáza, které nejčastěji katalyzují přeměny paranitrofenylfosfátu, ABTS a ONPG, respektive. Hydrolýzou těchto chromogenních substrátů vznikají barevné produkty, které lze stanovit spektrofotometricky nebo fluorescenčně [40, 53].

Imunochemické metody můžeme rozdělit na kompetitivní a nekompetitivní. U kompetitivních metod o vazebná místa protilátky soutěží značené i neznačené molekuly antigenu (a naopak). V rámci nekompetitivních metod dochází v přebytku protilátek k navázání protilátek na antigen, a nakonec je přidána sekundární značená protilátka, která reaguje s již navázaným antigenem. V této práci bude používána kompetitivní ELISA, proto bude zmíněna ve větším detailu [40].

V rámci kompetitivní ELISA spolu soutěží neznačený stanovovaný antigen se známým množstvím značeného antigenu o vazebná místa protilátky vázané na nosiči. Prakticky se nejprve imobilizuje protilátka, následuje promytí, přidavek stanovovaného antigenu, další promytí, a nakonec přidavek značeného antigenu. Nevýhodou této metody je omezené rozmezí detekce kvůli úzké citlivosti protilátek [39, 40].

Co se týče mykotoxinů, jsou imunochemické metody používány především pro svou citlivost, rychlost a jednoduchost, protože většinou nevyžadují přečištění vzorku. Jsou vhodné jako screeningové a semikvantitativní metody. ELISA kity jsou přenosné, ale v některých případech velmi drahé. Problémem těchto metod je cross reaktivita, kdy protilátka reaguje s látkou strukturně podobnou danému mykotoxinu. Často dochází k nadhodnocení výsledků. Další nevýhodou je, že jsou ELISA kity určeny pouze pro jediný analyt. Komerčně dostupné jsou ELISA kity pro aflatoxiny, fumonisiny, ochratoxin A, zearalenon, deoxynivalenol, T-2 a HT-2 toxin a citrinin [36, 37, 39].

Ve studii Papadopoulou [55] byly srovnávány dva komerčně dostupné ELISA kity pro stanovení deoxynivalenolu ve 313 pivech. U světlých piv byla výtěžnost kolem 111 % a u tmavých kolem 134 % u obou kitů. Ověření metody ELISA plynovou chromatografií s MS detektorem však ukázalo, že oba použité kity nadhodnocovaly obsah DON, pravděpodobně kvůli cross reaktivitě protilátek. Tento jev se rovněž objevil ve studii Kostelanské et al. [31]. V jiné studii [61] byly srovnávány čtyři komerčně dostupné ELISA kity pro stanovení DON a u všech docházelo ke cross reaktivitě s deoxynivalenol-3-glukosidem. Stejně tak bylo zjištěno, že nejen deriváty DON, ale i matrice přispívají k celkovému nadhodnocení výsledků získaných pomocí ELISA. Celkově ve studii docházelo k nadhodnocení výsledků až o 1000 % oproti výsledkům získaných pomocí HPLC-MS/MS.

2.7. Statistické zpracování experimentálních dat

Následující kapitola obsahuje výčet statistických metod použitých ke zpracování experimentálních dat.

2.7.1. Testování statistických hypotéz

Testování statistických hypotéz posuzuje, jestli jsou experimentálně získaná data v souladu s předpokladem, který se stanovil před provedením testování. Při testování statistických hypotéz se porovnávají dvě hypotézy, nulová a alternativní. Cílem testování je zjistit, jestli existuje vztah mezi dvěma nebo více skupinami dat. Nulová hypotéza říká, že mezi danými skupinami neexistuje rozdíl nebo vztah. Alternativní hypotéza popírá hypotézu nulovou [32].

Po stanoveních jednotlivých hypotéz se určí chybovost testu nebo také hladina významnosti α . Hladina významnosti je pravděpodobnost, že se zamítne nulová hypotéza, i když je správná. Většinou je hladina významnosti 0,05, tzn. 5 %. S takto zvolenou α se získá 95% jistota, že rozhodnutí o zamítnutí nebo přijetí nulové hypotézy je správné [32].

2.7.2. Shapirův-Wilkův test

Shapirův-Wilkův test je testem normality a určuje, zdali je rozdělení dat normální nebo ne. Normální rozdělení dat je rozdělení dat podle Gaussovy křivky, kdy se hodnoty proměnných symetricky shlukují kolem střední hodnoty. Nulová hypotéza Shapirova-Wilkova testu je, že data mají normální rozdělení. Pokud je tedy p -hodnota, čili hodnota pravděpodobnosti, nižší než hladina významnosti, tzn. pravděpodobnosti, že se zamítne nulová hypotéza, i když je správná, je nulová hypotéza zamítnuta a rozdělení dat lze považovat za nenormální. Pokud je p -hodnota vyšší než hladina významnosti, nulová hypotéza nemůže být zamítnuta [32, 34, 73].

2.7.3. Deanův-Dixonův Q test

Neparametrický Deanův-Dixonův test se používá k nalezení odlehlých hodnot, což jsou hodnoty v daném souboru dat, které jsou tak odlišné od zbytku dat, že jsou považovány za členy jiného souboru dat nebo jiné populace. Q test odečítá hodnoty, které jsou nejdále od průměru nebo mediánu od hodnoty, která je jí nejbližší. Výsledek je poté porovnán s kritickou hodnotou v tabulkách [34].

2.7.4. Korelace

Pearsonův korelační koeficient udává míru korelace mezi dvěma proměnnými. Dosahuje hodnot od -1 do 1, kdy hodnota 1 ukazuje silnou korelaci mezi proměnnými, kdy obě proměnné vzrůstají. Hodnota -1 ukazuje silnou korelaci, s tím, že jedna proměnná klesá a druhá stoupá. Hodnota korelačního koeficientu, která se blíží nule udává žádnou nebo velmi slabou korelaci mezi proměnnými [34].

Spearmanův korelační koeficient rovněž dosahuje hodnot od -1 do 1 a popisuje sílu korelace mezi proměnnými, ale používá se pro datové soubory s nenormální distribucí dat [32].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Seznam chemikálií

Tabulka 8 Použité standardy mykotoxinů

název	Mr (g/mol)	výrobce	země původu	CAS
deoxynivalenol	296,31	Sigma Aldrich	AT	51481-10-8
deoxynivalenol-3-glukosid	458,46	Sigma Aldrich	AT	131180-21-7
zearalenon	318,40	Sigma Aldrich	AT	17924-92-4
ochratoxin A	403,81	Sigma Aldrich	AT	303-47-9

Tabulka 9 Seznam použitých chemikálií

název	Mr (g/mol)	čistota	výrobce	země původu	CAS
acetonitril	41,05	>99,9 %	Sigma Aldrich	FR	75-05-08
methanol	32,04	>99,9 %	Sigma Aldrich	FR	67-56-1
kyselina mravenčí	46,02	98 %	Lachner	CZ	64-18-6
dihydrogenfosforečnan draselný	136,09	>99,5 %	Riedel-de Haën	DE	7778-77-0
hydrogenfosforečnan sodný	141,96	99,8 %	Lachner	CZ	7558-79-4
hydroxid sodný	39,99	99,8 %	Penta	CZ	1310-73-2
octan amonný	77,08	>99,0 %	Sigma Aldrich	DE	631-61-8
kyselina chlorovodíková	36,46	99,8 %	Penta	CZ	7647-01-0
dichlormethan	84,93	99,8 %	Chromservis	CZ	75-09-2
hydrogenuhlíčitán sodný	84,01	99,8 %	Lachner	CZ	144-55-8
kyselina octová	60,05	>99,8 %	Fluka	DE	64-19-7

3.2. Přístroje a zařízení

- Ultra účinný kapalinový chromatograf Waters Acquity
- Fluorescenční detektor Waters Acquity UPLC
- Kapalinový chromatograf Finnigan Surveyor
- Hmotnostní detektor Finnigan LCQ Advantage MAX
- Imunoafinitní kolonky OCHRAPREP®, R-Biopharm
- Imunoafinitní kolonky DONPREP®, R-Biopharm
- Imunoafinitní kolonky EASI-EXTRACT® ZEARELENONE, R-Biopharm
- Imunoafinitní kolonky 11+Myco MS-PREP®, R-Biopharm
- Certifikovaný referenční materiál ochratoxinu A – pšenice přirozeně kontaminovaná ochratoxinem A o koncentraci 4,8 µg/kg, Trilogy®
- RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 Enzyme immunoassay
- RIDASCREEN® DON Enzyme immunoassay
- RIDASCREEN® Zearalenon Enzyme immunoassay
- Dynex Opsys MR™ Microplate Reader
- Laboratorní váha Sartorius GE 512-0 CE
- Laboratorní sklo
- Centrifuga Sigma 2-16 KC

- Třepačka
- Elektrická vodní lázeň Medigen
- Automatické pipety
- Mikrostříkačka Hamilton 710 NR
- Rotační vakuová odparka IKA® RV 10
- Vakuové zařízení Visiprep™ SPE Vacuum Manifold
- Ultrazvuk ELMA S120 Elmasonic
- pH metr Mettler Toledo

3.3. Popis analyzovaných vzorků

Ke sledování závislosti koncentrace deoxynivalenolu a ochratoxinu A na čase bylo analyzováno celkem 49 různých pív pocházejících z České republiky, Slovenska, Maďarska, Rumunska a Polska. Převážně se jednalo o světlá výčepní piva a ležáky, ve vysokém zastoupení byla také polotmavá a tmavá piva (výčepní, ležáky a speciály). Vybráno bylo i několik bezlepkových a nealkoholických pív.

Dále byl v této práci monitorován obsah ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu. Celkem se tyto tři mykotoxiny stanovovaly v 94 vzorcích pív pocházejících z výše uvedených zemí, Německa, Dánska a Belgie. Celkový přehled vzorků, země původu a typy pív jsou uvedeny v tabulkách níže. Mykotoxiny byly stanovovány pomocí různých metod, které byly poté srovnávány mezi sebou.

Tabulka 10 Přehled vzorků podle druhu piva

druh piva	počet vzorků
světlý ležák	39
světlé	13
tmavé	13
světlé výčepní	10
bezlepkové nealkoholické	7
polotmavé	5
světlý bezlepkový ležák	4
tmavý bezlepkový speciál	3

Tabulka 11 Přehled vzorků podle země původu

země původu	počet
Česká republika	66
Polsko	9
Rumunsko	9
Slovensko	4
Maďarsko	3
Belgie	1
Německo	1
Dánsko	1

3.4. Stanovení ochratoxinu A pomocí UPLC-FLR

3.4.1. Validace metody UPLC-FLR

Validace metody je proces ujištění, že analytická metoda nebo postup jsou vhodné pro daný účel a splňují určité požadavky. Vlastnosti metody se vyjadřují v pojmech analytických charakteristik: výtěžnost, správnost, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost, přesnost, selektivita, specifická, rozsah a robustnost [67].

3.4.1.1. Výtěžnost

Výtěžnost je poměr množství analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě [67]. Ke stanovení výtěžnosti byl použit certifikovaný referenční materiál (CRM), který byl následně analyzován v celkem 8 stanoveních. Výtěžnost byla vypočítána podle následujícího vzorce,

$$R = \frac{x}{C_R} \cdot 100 [\%] \quad (3.1)$$

kde R je výtěžnost, x je průměr stanovených koncentrací ochratoxinu A [ng/l] a C_R vyjadřuje obsah ochratoxinu A v certifikovaném referenčním materiálu v ng/l.

3.4.1.2. Správnost

Správnost je těsnost souhlasu mezi jediným výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou dané veličiny a bývá stanovena jako procento analytu, které bylo získáno danou metodou. Ke stanovení správnosti se výsledky dané metody srovnávají s výsledky analýzy referenčního materiálu, srovnáním s druhou validovanou metodou, případně analýzou vzorků naspikovaných známým množstvím analytu [34, 67].

Ke stanovení správnosti byl použit certifikovaný referenční materiál, který byl následně analyzován v celkem 8 stanoveních. Správnost byla vypočítána podle následující nerovnice [69],

$$x_{ref} - 2 \cdot s_{ref} < \bar{x} < x_{ref} + 2 \cdot s_{ref} \quad (3.2)$$

kde x_{ref} je deklarovaná koncentrace ochratoxinu A [ng/l], s_{ref} je deklarovaná směrodatná odchylka a \bar{x} je průměrná hodnota stanovené koncentrace OTA v CRM [ng/l].

3.4.1.3. Linearita

Linearita definuje schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné koncentraci analytu. Jedná se o přímkovou závislost mezi dvěma proměnnými, např. analytickým signálem a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné shody dvou proměnných je charakterizována korelačním koeficientem [33, 67]. Kalibrační křivka byla sestavena z šesti kalibračních bodů o koncentracích, které odpovídaly očekávané koncentraci ochratoxinu A v pivě (0,1–10 ng/l).

3.4.1.4. Mez detekce

Mez detekce (LOD) určitého analytického postupu je definována jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, nemusí však být stanoveno jako exaktní hodnota [67]. Mez detekce byla vypočítána z chromatogramu standardu, jehož koncentrace se blížila dolní hranici kalibrační závislosti, jako trojnásobek poměru signálu a šumu.

3.4.1.5. Mez kvantifikace

Mez kvantifikace (LOQ) je nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s přijatelnou přesností (opakovatelností) a správností za uvedených podmínek zkoušky [67]. Mez kvantifikace byla vypočítána z chromatogramu standardu, jehož koncentrace se blížila dolní hranici kalibrační závislosti, jako desetinásobek poměru signálu a šumu.

3.4.1.6. Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě a za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Jedná se o schopnost metody vytvářet stejné výsledky v krátkém časovém období za stejných podmínek [34, 67]. Ke zjištění opakovatelnosti byl šestkrát analyzován obsah ochratoxinu A v jednom vzorku. Následně byl vypočítán průměr \bar{x} , směrodatná odchylka s a relativní směrodatná odchylka RSD .

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%] \quad (3.3)$$

3.4.2. Příprava certifikovaného referenčního materiálu k analýze OTA

K validaci metody UPLC-FLR byl použit certifikovaný referenční materiál (CRM) ochratoxinu A. 10 g CRM bylo extrahováno 100 ml 60% acetonitrilu 50 minut na třepače. Poté byl materiál zcentrifugován a 2 ml supernatantu byly smíchány s 22 ml PBS pufru a naneseny na imunoafinitní kolonku OCHRAPREP®. Vzorek se nechal prokapávat rychlostí 2 ml/min nebo nižší. Kolonka byla poté pročištěna 20 ml PBS pufru, čímž se odstranily nenavázané komponenty vzorku. Ochatoxin A byl nakonec eluován 2 ml směsí 98% methanolu a 2% kyseliny octové. Výrobce doporučena eluční rychlost byla 1 kapka za sekundu, v této práci se však eluční směs nechala prokapávat výrazně pomaleji. Získaný eluát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 1 ml 50% methanolu a nadávkován do vialek.

3.4.3. Příprava kalibračních roztoků OTA

Pro tuto práci byl použit standard ochratoxinu A od firmy Sigma-Aldrich o koncentraci 10 µg/ml. Zásobní roztok o koncentraci 100 ng/ml byl ředěn v příslušných poměrech 50% methanolem. Celkem bylo ředěním zásobního roztoku připraveno 7 kalibračních roztoků o koncentraci 0,1; 0,2; 0,6; 1; 2; 5 a 10 ng/l.

3.4.4. Příprava vzorků k analýze OTA pomocí UPLC-FLR

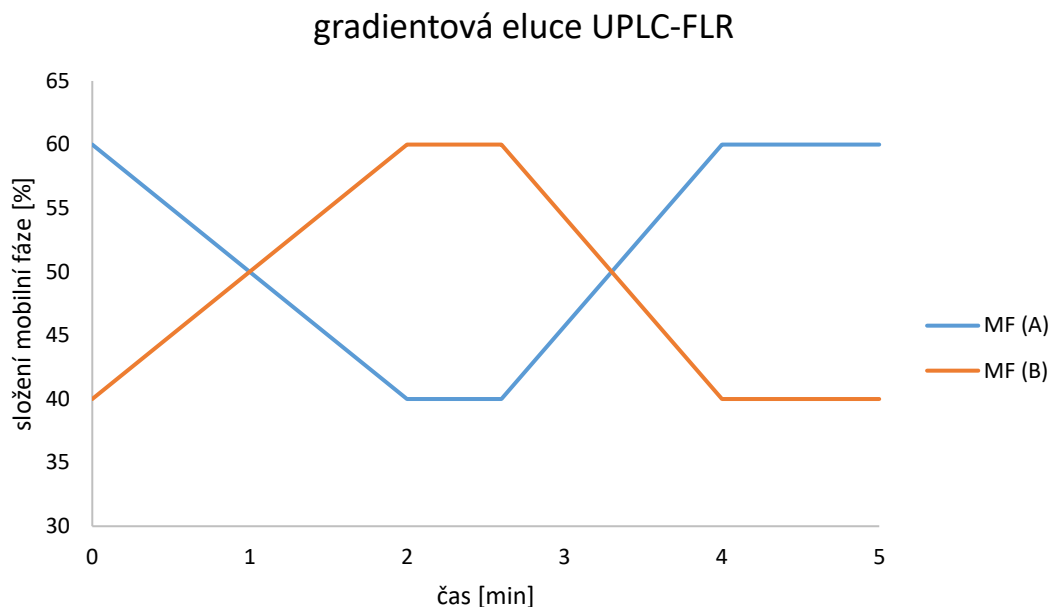
Příprava vzorků pív k analýze pomocí UPLC se skládala z několika kroků. Nejdříve bylo zhruba 100 ml vzorku odplyněno na ultrazvuku, poté bylo upraveno pH vzorku na 7,4 pomocí 2 M hydroxidu sodného. Následně bylo 25 ml vzorku nanášeno na imunoafinitní kolonku OCHRAPREP®, kde se vzorek nechal prokapávat rychlostí 2 ml/min nebo nižší. Imunoafinitní kolonka obsahuje monoklonální protilátku, která specificky váže ochratoxin A. Kolonka byla pročištěna 50 ml PBS pufru, čímž se odstranily nenavázané komponenty vzorku. Ochratoxin A byl nakonec eluován 2 ml směsí 98% methanolu a 2% kyseliny octové. Eluční rychlost byla 1 kapka za sekundu nebo nižší. Získaný eluát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 500 µl 50% methanolu a nadávkován do vialek.

3.4.5. Analýza vzorků pív UPLC-FLR

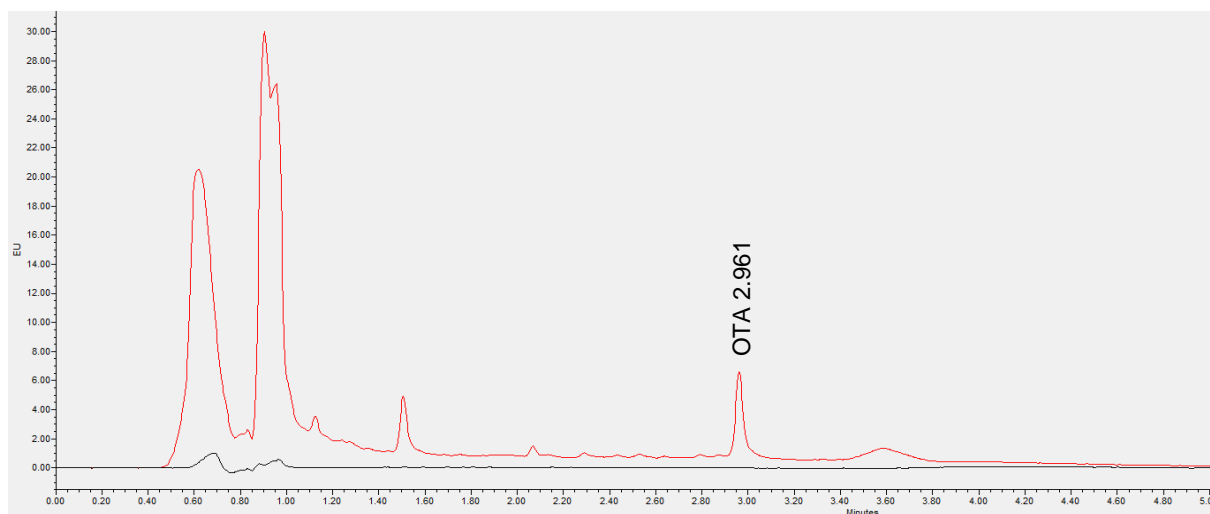
Pro analytické stanovení ochratoxinu A v pivu byl použit ultra účinný kapalinový chromatograf Waters Acquity ve spojení s fluorescenčním detektorem Waters Acquity. Separace byla provedena na chromatografické koloně Luna Omega. Detailní informace o parametrech stanovení jsou uvedeny v tabulce 12. Profil gradientu mobilní fáze je zobrazen v grafu 1. Délka analýzy jednoho vzorku byla 5 minut.

Tabulka 12 Parametry stanovení ochratoxinu A metodou UPLC-FLR

objem nástřiku	10 µl	
průtok mobilní fáze	0,3 ml/min	
složení mobilní fáze A	2% ACN; 0,3% HCOOH; 97,7% H ₂ O	
složení mobilní fáze B	100% ACN	
teplota	laboratorní	
kolona	Luna Omega 1,6 µm C18 100x2,1 mm	
detekce	λ_{ex}	335 nm
	λ_{em}	440 nm



Graf 1 Gradientová eluce UPLC-FLR



Obrázek 3 Chromatogram reálného vzorku piva (červená) a blanku (černá)

3.5. Stanovení ochratoxinu A pomocí metody ELISA

RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 je kompetitivní ELISA určená ke kvantitativní analýze ochratoxinu A v obilovinách, krmivech, pivě a prasečím séru. Principem metody je reakce protilátky a antigenu. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickou protilátkou proti ochratoxinu A. Po přidavku vzorku a enzymového konjugátu spolu volný a enzymově konjugovaný ochratoxin A soutěží o vazebná místa protilátky. Nenavázaný ochratoxin A je poté odstraněn v promývacím kroku. Poté se přidá chromogenní substrát a během inkubace navázaný enzymový konjugát přeměňuje chromogen na barevný produkt. Po inkubaci

následuje přidavek stop roztoku, který způsobí změnu barvy z modré na žlutou. Výsledná absorbance se stanovuje spektrofotometricky při 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci ochratoxinu A ve vzorku [64].

3.5.1. Příprava vzorků k analýze OTA pomocí ELISA

Zhruba 20 ml vzorku piva bylo odplyněno, následně se ke 2 ml vzorku v centrifugační zkumavce přidaly 2 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a 4 ml dichlormethanu. Vzorek se 5 minut třepal na třepačce a poté byl zcentrifugován. Horní vodná vrstva byla odebrána a 2 ml dolní dichlormethanové vrstvy byly přeneseny do další centrifugační zkumavky, kde proběhla extrakce 2 ml 0,13 M hydrogenuhličitanem sodným. Vzorek byl třepán na třepačce a zcentrifugován. Následně se odebrala a uchovala horní vodná fáze. Nepolární fáze byla znovu extrahována roztokem hydrogenuhličitanu sodného, protřepána a zcentrifugována. Hydrogenuhličitanové vrstvy byly smíchány a naředěny 0,75 ml 1 M kyseliny chlorovodíkové a 2 ml dichlormethanu. Potom byl vzorek znovu promíchán a zcentrifugován. Odebrala se vodná fáze a celá dichlormethanová fáze byla odpařena ve vakuové odparce při 60 °C. Zbytek vzorku byl rozpuštěn v 1 ml 0,13 M hydrogenuhličitanu sodném.

3.5.2. Analýza vzorků pív

Před samotnou analýzou byl naředěn koncentrovaný enzymový konjugát ředicím pufrém v poměru 1:11. Dále bylo nutné připravit promývací pufr – PBS Tween, rozpuštěním předpřipravené směsi dodané výrobcem ve vodě. 50 µl vzorku nebo standardu bylo naneseno do jamek mikrotitrační destičky a bylo přidáno 50 µl zředěného enzymového konjugátu. Následovala půlhodinová inkubace při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Kapalná fáze byla po inkubaci z jamek odstraněna vyklepnutím a několikrát se nanesl promývací pufr, který byl taktéž odstraněn. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl substrátu a následně proběhla inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Nakonec byl do každé jamky přidán stop roztok, který způsobil změnu barvy z modré na žlutou. Výsledná intenzita zbarvení byla stanovena spektrofotometricky při 450 nm.

3.5.3. Parametry metody ELISA

Veškeré parametry byly převzaty z manuálu dodaného výrobcem [64].

Tabulka 13 Parametry stanovení ochratoxinu A metodou ELISA

limit detekce	50 ng/l
výtěžnost	100 %
specifita pro ochratoxin A	100 %

3.5.4. Vyhodnocení výsledků

Obsah ochratoxinu A v pivě v ng/l byl vypočítán pomocí softwaru RIDA SOFT Win z připravené kalibrační křivky.

3.6. Stanovení deoxynivalenolu pomocí metody HPLC-MS

3.6.1. Příprava kalibračních roztoků deoxynivalenolu a deoxynivalenol-3-glukosidu

Pro tuto práci byly použity standardy deoxynivalenolu a deoxynivalenol-3-glukosidu od firmy Sigma-Aldrich o koncentraci 100 µg/ml a 50 µg/ml, respektive. Směsný standard o koncentraci 1 µg/ml byl ředěn v příslušných poměrech 50% methanolem. Celkem bylo ředěním zásobního roztoku připraveno 6 kalibračních roztoků o koncentraci 1, 5, 10, 50, 80 a 100 ng/ml DON a D3G.

3.6.2. Příprava vzorků k analýze deoxynivalenolu pomocí HPLC-MS

Příprava vzorků k analýze pomocí HPLC-MS se skládala z několika kroků. Nejdříve bylo zhruba 100 ml vzorku odplyněno na ultrazvuku po dobu 15 minut. Následně byly 2 ml takto upraveného vzorku nanесeny na imunoafinitní kolonku DONPREP®, kde se vzorek nechal prokapávat rychlostí 2 ml/min. Imunoafinitní kolonka obsahovala monoklonální protilátku, která specificky navázala deoxynivalenol. Kolonka byla přechištěna 5 ml deionizované vody, čímž se odstranily nenavázané komponenty vzorku. Deoxynivalenol byl nakonec eluován 2 ml methanolu. Výrobce doporučena eluční rychlost byla 1 kapka za sekundu, v této práci se však eluční směs nechala prokapávat výrazně pomaleji. Získaný eluát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 1 ml 50% methanolu a nadávkován do vialek.

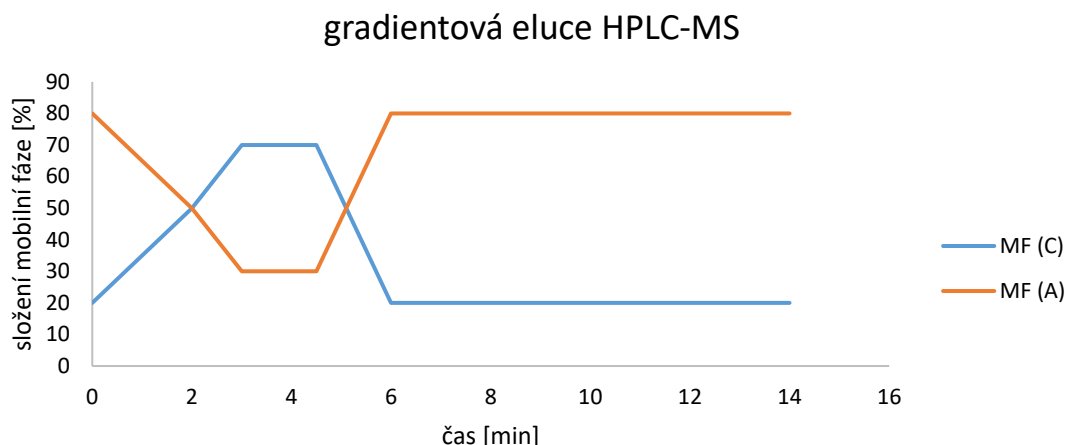
V případě použití imunoafinitních kolonek 11+Myco MS-PREP® bylo odplyněno zhruba 50 ml vzorku a upraveno pH na 7,4 hydroxidem sodným. Následně bylo na imunoafinitní kolonku nanесeno 5 ml vzorku a vzorek se nechal prokapávat rychlostí 2 ml/min nebo nižší. Kolonka byla poté pročištěna 20 ml deionizované vody. Deoxynivalenol byl nakonec eluován 2 ml methanolu. Získaný eluát byl odpařen do sucha na vakuové odparce. Před nástřikem byl vzorek rozpuštěn v 1 ml 50% methanolu a nadávkován do vialek.

3.6.3. Analýza vzorků pív HPLC-MS

Pro analytické stanovení deoxynivalenolu a deoxynivalenol-3-glukosidu v pivu byl použit kapalinový chromatograf HPLC Finnigan Surveyor ve spojení s hmotnostním detektorem Finnigan LCQ Advantage MAX. K separaci byla použita chromatografická kolona Synergi 4µ Hydro RP 80A 150 x 3 mm. Detailní informace o parametrech stanovení jsou uvedeny v tabulce 14. Separace byla provedena gradientovou elucí, profil gradientu mobilní fáze je zobrazen v grafu č. 2. Jako iontový zdroj hmotnostního detektoru byla použita chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v negativním módu. Délka analýzy jednoho vzorku byla 14 minut.

Tabulka 14 Parametry stanovení DON pomocí HPLC-MS

objem nástřiku	25 µl
průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
složení mobilní fáze A	10 mM octan amonný
složení mobilní fáze C	methanol
teplota	40 °C
kolona	Synergi 4µ Hydro RP 80A 150 x 3 mm



Graf 2 Gradient mobilní fáze HPLC-MS (A – octan amonný, C – methanol)

3.7. Stanovení deoxynivalenolu pomocí metody ELISA

RIDASCREEN® DON je kompetitivní imunochemická metoda určená ke kvantitativní analýze deoxynivalenolu v obilovinách, sladu, krmivech, pivu a mladině. Principem metody je reakce protilátky a antigenu. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickými protilátkami, které působí na protilátky určené proti deoxynivalenolu. Po přidavku vzorku, enzymového konjugátu a protilátek proti deoxynivalenolu spolu volný a enzymově konjugovaný deoxynivalenol soutěží o vazebná místa protilátky. Současně dochází k navázání protilátek proti DON na imobilizované protilátky v jamkách. Nenavázaný deoxynivalenol je poté odstraněn v promývacím kroku. Poté se přidá chromogenní substrát a během inkubace navázaný enzymový konjugát přeměňuje chromogen na modrý produkt. Po inkubaci následuje přidavek stop roztoku, který způsobí změnu barvy z modré na žlutou. Výsledná absorbance je stanovena spektrofotometricky při 450 nm. Absorbance je nepřímo úměrná koncentraci deoxynivalenolu ve vzorku [65].

3.7.1. Příprava vzorků k analýze DON pomocí ELISA

Příprava vzorků zahrnovala pouze odplynění zhruba 20 ml piva. Poté bylo nanášeno 50 µl neředěného vzorku do jamek mikrotitrační destičky.

3.7.2. Analýza vzorků pív

Před samotnou analýzou bylo nutné připravit promývací pufr, PBS Tween, rozpuštěním předpřipravené směsi dodané výrobcem ve vodě. Do jamek mikrotitrační destičky bylo nanášeno 50 µl vzorku nebo standardu. Dále bylo přidáno 50 µl enzymového konjugátu a 50 µl roztoku protilátek proti deoxynivalenolu. Následovala půlhodinová inkubace při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Kapalná fáze byla po inkubaci z jamek odstraněna a několikrát se nanášel promývací pufr, který byl taktéž odstraněn. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl substrátu a poté proběhla inkubace po dobu 15 minut při laboratorní teplotě. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 100 µl stop roztoku, který způsobil změnu barvy z modré na žlutou. Výsledná intenzita zbarvení byla stanovena spektrofotometricky při 450 nm.

3.7.3. Parametry metody ELISA

Veškeré parametry byly převzaty z manuálu dodaného výrobcem [65].

Tabulka 15 Parametry stanovení deoxynivalenolu metodou ELISA

limit detekce	3,7 µg/l
výtěžnost	85–110 %
specifita pro deoxynivalenol	100 %

3.7.4. Vyhodnocení výsledků

Obsah deoxynivalenolu v pivě v µg/l byl vypočítán pomocí softwaru RIDA SOFT Win z připravené kalibrační křivky.

3.8. Stanovení zearalenonu pomocí metody HPLC-MS

3.8.1. Příprava kalibračních roztoků ZON

Pro tuto práci byl použit standard zearalenonu od firmy Sigma-Aldrich o koncentraci 100 µg/ml. Zásobní roztok o koncentraci 1 µg/ml byl ředěn v příslušných poměrech 50% methanolem. Celkem bylo ředěním zásobního roztoku připraveno 5 kalibračních roztoků o koncentraci 10, 20, 50, 100 a 200 ng/ml.

3.8.2. Příprava vzorků k analýze ZON pomocí HPLC-MS

Pro stanovení zearalenonu v pivě metodou HPLC-MS byl vzorek nejprve přečištěn přes imunoafinitní kolonku. Vzorek piva byl odplyněn na ultrazvuku po dobu 15 minut. Poté bylo upraveno pH vzorku na 7,4 pomocí 2 M hydroxidu sodného. Na imunoafinitní kolonku EASI-EXTRACT® ZEARENONE bylo nanášeno 25 ml takto upraveného vzorku. K promytí kolonky bylo použito 50 ml PBS pufru. Eluce byla provedena pomocí 2 ml acetonitrilu s průtokem jedné kapky za sekundu nebo pomaleji. Získaný eluát byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce a následně rozpuštěn v 0,5 ml 50% methanolu.

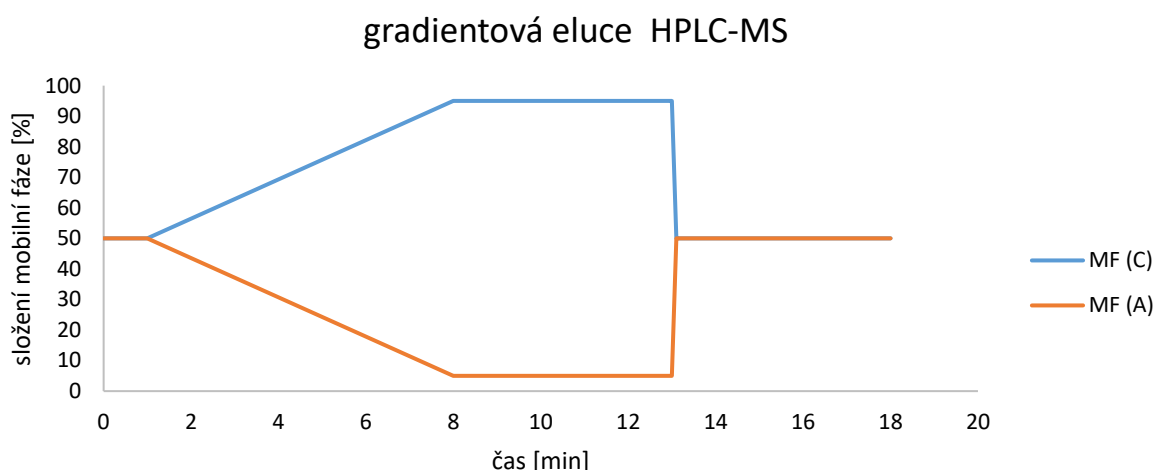
3.8.3. Analýza vzorků pív HPLC-MS

K identifikaci a kvantifikaci zearalenonu v pivě metodou HPLC-MS byl použit kapalinový chromatograf HPLC Finnigan Surveyor ve spojení s hmotnostním detektorem Finnigan LCQ

Advantage MAX. Parametry stanovení zearalenonu pomocí HPLC-MS jsou uvedeny v tabulce č. 16. K separaci byla použita chromatografická kolona Synergi 4 μ Hydro RP 80A 150 x 3 mm. V rámci analýzy byla použita chemická ionizace za atmosférického tlaku v negativním módu. Byla použita gradientová eluce, profil gradientu mobilní fáze je zobrazen v grafu č. 3. Délka analýzy jednoho vzorku byla 18 minut.

Tabulka 16 Parametry stanovení zearalenonu pomocí HPLC-MS

objem nástřiku	25 μ l
průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
složení mobilní fáze A	10 mM octan amonný
složení mobilní fáze C	methanol
teplota	40 °C
kolona	Synergi 4 μ Hydro RP 80A 150 x 3 mm



Graf 3 Gradient mobilní fáze (A – octan amonný, C – methanol)

3.9. Stanovení zearalenonu pomocí metody ELISA

RIDASCREEN® Zearalenon je kompetitivní ELISA určená ke kvantitativní analýze zearalenonu v obilovinách, krmivech, pivu, séru a moči. Principem metody je reakce protilátky a antigenu. Jamky mikrotitrační destičky jsou pokryté specifickými protilátkami proti zearalenonu. Po přidavku vzorku a enzymového konjugátu spolu volný a enzymově konjugovaný zearalenon soutěží o vazebná místa protilátky. Nenavázaný enzymový konjugát je poté odstraněn v promývacím kroku. Poté se přidá chromogenní substrát a během inkubace navázaný enzymový konjugát přeměňuje bezbarvý chromogen na modrý produkt. Po inkubaci následuje přidavek stop roztoku, který způsobí změnu barvy z modré na žlutou. Výsledná absorbance je stanovena spektrofotometricky při 450 nm. Absorbance je nepřímě úměrná koncentraci zearalenonu ve vzorku [66].

3.9.1. Příprava vzorků k analýze ZON pomocí ELISA

Příprava vzorků zahrnovala odplynění zhruba 20 ml piva. Poté byl vzorek naředěn 1:5 ředícím pufrem.

3.9.2. Analýza vzorků pív

Před samotnou analýzou byl naředěn koncentrovaný enzymový konjugát ředícím pufrem v poměru 1:11 a do jamek mikrotitrační destičky bylo naneseno 50 µl vzorku nebo standardu. Dále bylo přidáno 50 µl zředěného enzymového konjugátu. Následovala dvouhodinová inkubace při laboratorní teplotě bez přístupu světla. Kapalná fáze byla po inkubaci z jamek odstraněna a několikrát se nanesla destilovaná voda, která byla taktéž odstraněna. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl substrátu a 50 µl chromogenu a následně proběhla inkubace po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Nakonec bylo do každé jamky přidáno 100 µl stop roztoku, který způsobil změnu barvy. Výsledná intenzita zbarvení byla stanovena spektrofotometricky při 450 nm.

3.9.3. Parametry metody ELISA

Veškeré parametry byly převzaty z manuálu dodaného výrobcem [66].

Tabulka 17 Parametry stanovení zearalenonu metodou ELISA

limit detekce	0,25 µg/l
výtěžnost	80 %
specifita pro zearalenon	100 %

3.9.4. Vyhodnocení výsledků

Obsah zearalenonu v pivě v µg/l byl vypočítán pomocí softwaru RIDA SOFT Win z připravené kalibrační křivky.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V následující kapitole jsou prezentovány a diskutovány výsledky validace použitých metod a studia stability vybraných mykotoxinů v pivu. Kapitola 4.1 posuzuje jednotlivé validační parametry metod, srovnává je s literaturou a diskutuje vhodnost těchto metod ke stanovení mykotoxinů. Kapitola 4.2 je rozdělena podle jednotlivých mykotoxinů a jsou zde diskutovány stanovené hladiny mykotoxinů v pivech, vzájemné srovnání metod použitých ke stanovení mykotoxinů, stabilita mykotoxinů v čase a jejich toxicita na daných koncentračních hladinách.

4.1. Validace instrumentálních metod

4.1.1. Ochratoxin A

4.1.1.1. Validace metody UPLC-FLR

K validaci UPLC-FLR byl použit certifikovaný referenční materiál ochratoxinu A – pšenice přirozeně kontaminovaná ochratoxinem A o koncentraci 4,8 µg/kg, dále byl k validaci vybrán vzorek světlého výčepního piva na základě jeho zvýšené koncentrace OTA. Validační parametry byly vypočítány z dat v tabulkách 18 a 19. Definice jednotlivých parametrů, postupy jejich stanovení a výpočtu jsou detailněji rozepsány v kapitole 3.4.1.

Tabulka 18 Koncentrace OTA v certifikovaném referenčním materiálu

č. měření	koncentrace OTA [ng/l]
1	4,82
2	3,71
3	3,91
4	3,65
5	5,61
6	6,48
7	6,49
8	4,45

Tabulka 19 Koncentrace OTA ve vzorku piva

č. měření	koncentrace OTA [ng/l]
1	42,15
2	43,21
3	36,49
4	31,62
5	38,92
6	35,04

Výtěžnost

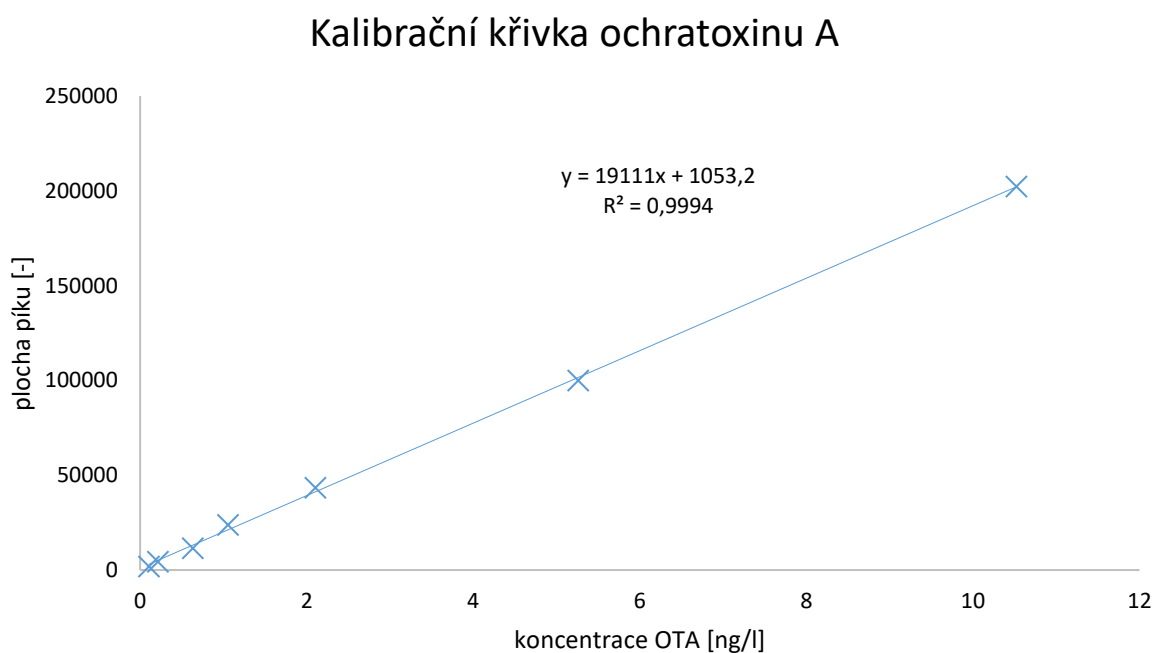
Výtěžnost byla vypočítána z dat v tabulce 18 podle rovnice (3.1). Průměr výše uvedených hodnot, 4,89 µg/kg, se shoduje s koncentrací ochratoxinu A deklarované v certifikovaném referenčním materiálu (4,8 µg/kg). Výtěžnost metody IAC-UPLC-FLR byla stanovena na 101,88 %.

Správnost

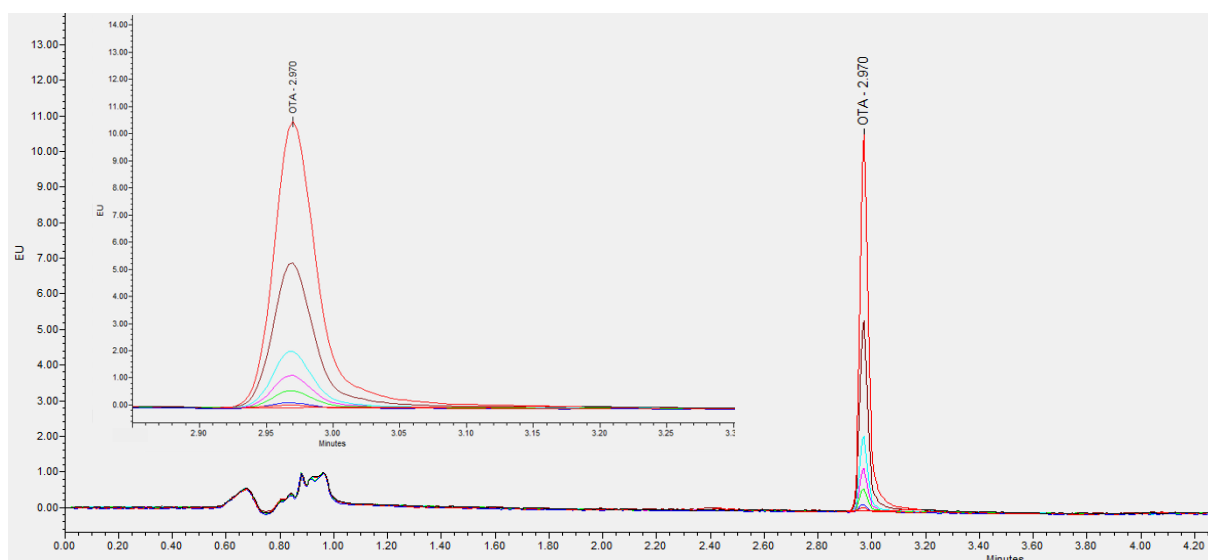
Správnost byla vypočítána z dat v tabulce 18 podle rovnice (3.2). Jelikož platila nerovnost (3.2) byla prokázána správnost metody pro danou matici a koncentrační úroveň.

Linearita

Výsledné hodnoty sedmi proměřených standardů ochratoxinu A byly zpracovány do bodového grafu. Na obrázku níže je zobrazena ukázka kalibrační křivky a vzorový chromatogram. Z grafu a hodnoty korelačního koeficientu R^2 , který charakterizuje těsnost vzájemné závislosti dvou proměnných, je patrné, že je metoda IAC-UPLC-FLR vhodná ke stanovení ochratoxinu A v pivech.



Graf 4 Závislost plochy chromatografického píku na koncentraci OTA



Obrázek 4 Chromatogram standardu ochratoxinu A o koncentraci 0,1; 0,2; 0,6; 1; 2; 5 a 10 ng/l v různém přiblížení

Mez detekce

Mez detekce byla vypočítána jako trojnásobek poměru signálu a šumu získaných z chromatogramu. LOD byla 0,3 ng/l.

Mez kvantifikace

Mez kvantifikace byla vypočítána jako desetinásobek poměru signálu a šumu získaných z chromatogramu. LOQ byla 1 ng/l.

Opakovatelnost

Opakovatelnost byla stanovena opakovanou přípravou stejného vzorku pomocí stejného postupu, na stejném přístroji a za stejných podmínek. Po výpočtu směrodatné odchylky výběru a průměru byla za použití vztahu (3.3) vypočítána relativní směrodatná odchylka RSD. Opakovatelnost metody IAC-UPLC-FLR byla vypočítána z dat v tabulce č. 19 a stanovena na 11,61 %.

V případě, že byla použita data z tabulky č. 18, kde se stanovovala koncentrace OTA v certifikovaném referenčním materiálu, byla relativní směrodatná odchylka 24,08 %. Tak vysoká hodnota může být způsobena tím, že referenční hodnota koncentrace ochratoxinu A se blíží mezi kvantifikace použité metody a výsledky jsou tím pádem méně přesné. Druhým důvodem může být to, že CRM byla pevná matrice a příprava vzorku zahrnovala krok navíc oproti kapalně matrici. Ochratoxin A z CRM bylo nutné extrahovat 60% acetonitrem, kdežto u vzorku piva se extrakční krok vynechal. Stanovení koncentrace OTA v CRM tak mohlo být zatíženo větší chybou a horší opakovatelností než u vzorku piva. V poslední řadě je nutné podotknout, že RSD udávaná výrobcem CRM je 20,8 %, takže je opakovatelnost v rámci této koncentrační hladiny dobrá.

Pro další výpočty byla vždy použita RSD 11,61 %, jelikož tato hodnota byla získaná ze vzorku piva, tudíž lépe odpovídá reálným vzorkům, které budou analyzovány.

Tabulka 20 Souhrnná tabulka validačních parametrů UPLC-FLR

výtěžnost [%]	101,9
linearita – R²	0,9994
LOD [ng/l]	0,3
LOQ [ng/l]	1
opakovatelnost [%]	11,6

4.1.1.2. Srovnání parametrů použité metody s dalšími metodami v literatuře

Tabulka 21 Srovnání některých validačních parametrů napříč literaturou v rámci stanovení ochratoxinu A v pивě

zdroj	metoda	přečištění	výtěžnost [%]	LOD [ng/l]
[33]	HPLC-FLR	IAC	86-88	1
[51]	HPLC-FLR	IAC	91	5
[58]	HPLC-FLR	IAC	97	2
[70]	HPLC-FLR	SPE	82-100	100
[70]	HPLC-FLR	IAC	97	100
[71]	HPLC-FLR	IAC	87-95	10
DP	UPLC-FLR	IAC	102	0,3

Z tabulky je patrné, že většina autorů při kvantitativním stanovení ochratoxinu A v pивě dává přednost IAC-HPLC-FLR. Tato metoda je dostatečně přesná a fluorescenční detektor zaručuje vysokou citlivost. Až na jednu výjimku jsou limity detekce dostatečně nízké, aby bylo možné stanovit obsah OTA v pивě, který se zde vyskytuje v koncentracích kolem 24 ng/l [20].

Výsledky validace metody v této práci ukazují, že výtěžnost je lepší ve srovnání s ostatními studiemi a limit detekce je oproti ostatním autorům nižší. Ultra účinná kapalinová chromatografie poskytuje oproti HPLC nižší meze detekce, vyšší citlivost a lepší rozlišení.

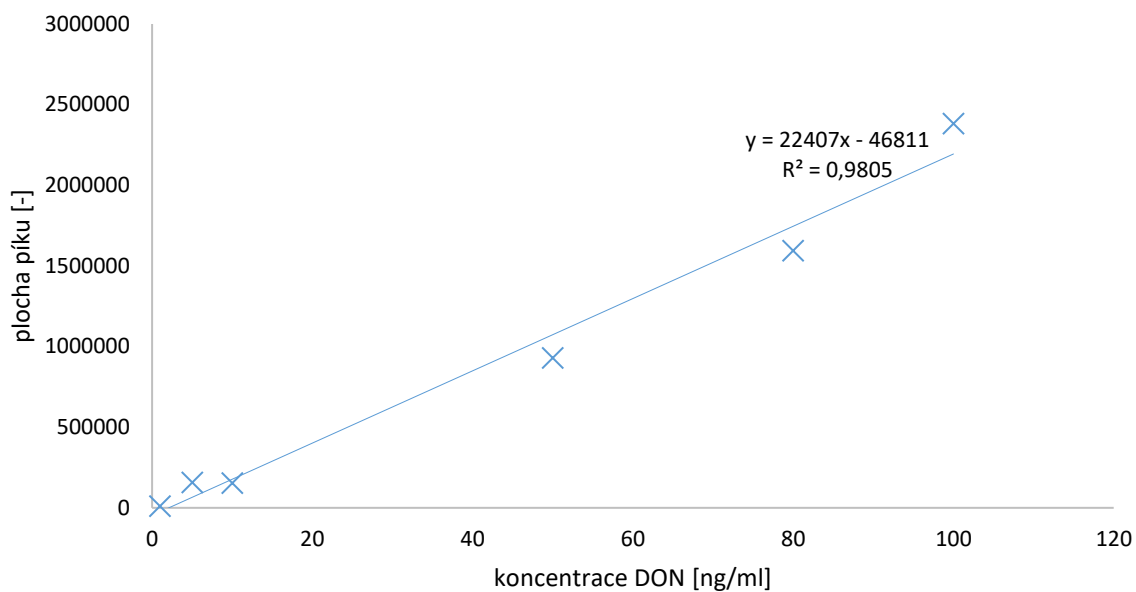
4.1.2. Deoxynivalenol a deoxynivalenol-3-glukosid

4.1.2.1. Validace HPLC-MS

Linearita

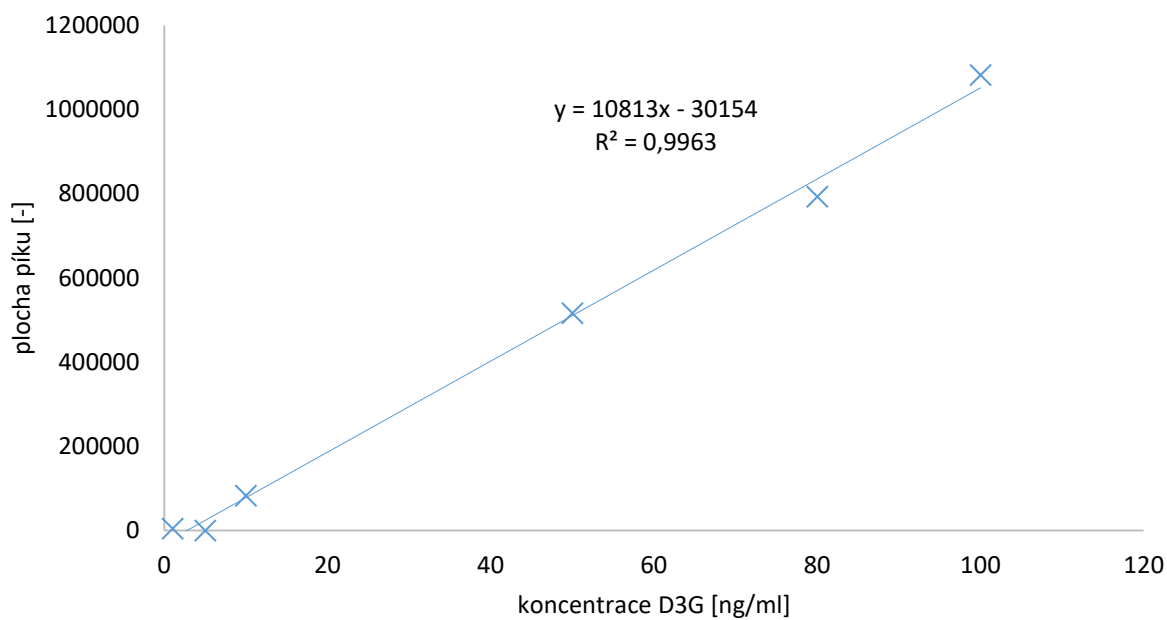
Výsledné hodnoty proměřených standardů deoxynivalenolu a deoxynivalenol-3-glukosidu byly zpracovány do bodového grafu. Na obrázcích níže je zobrazena ukázka kalibračních křivek, vzorové chromatogramy a MS spektra standardů.

Kalibrační křivka deoxynivalenolu



Graf 5 Závislost plochy chromatografického píku na koncentraci DON

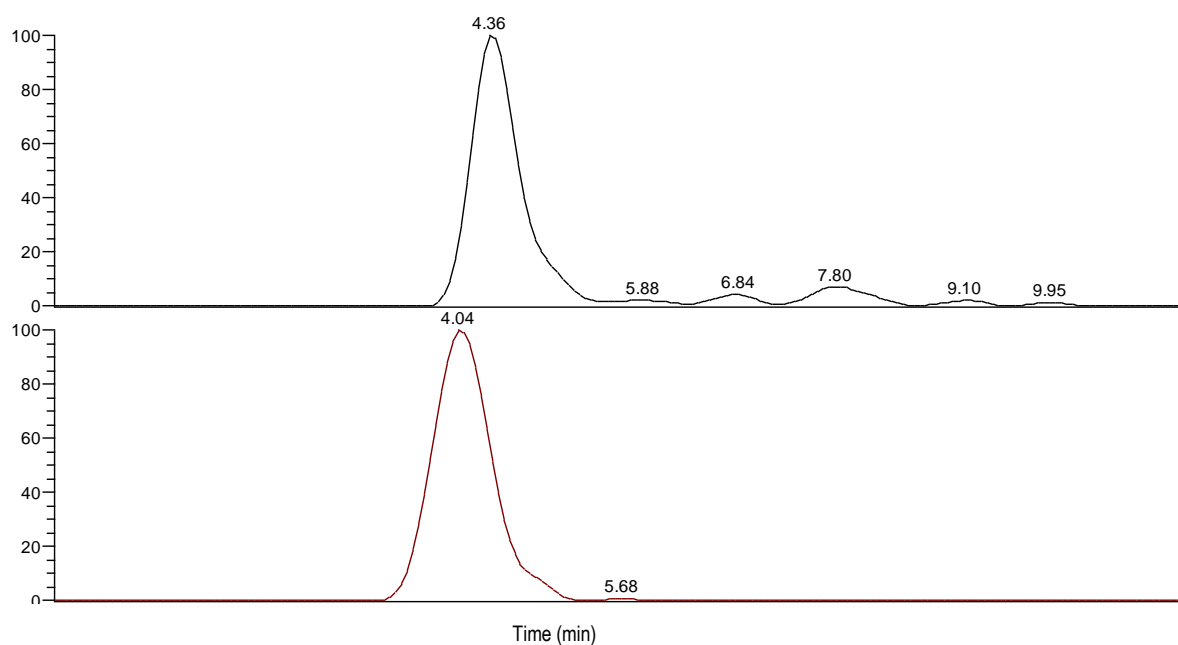
Kalibrační křivka deoxynivalenol-3-glukosidu



Graf 6 Závislost plochy chromatografického píku na koncentraci D3G



Obrázek 5 Hmotnostní spektrum DON (nahore) a D3G (dole)



Obrázek 6 Chromatografické piky standardu DON (nahore) a D3G (dole)

Mez detekce a mez kvantifikace

Mez detekce byla vypočítána jako trojnásobek poměru signálu a šumu získaných z chromatogramu a byla stanovena na 0,7 µg/l. Mez kvantifikace byla vypočítána jako desetinásobek poměru signálu a šumu získaných z chromatogramu a byla 2,3 µg/l. LOD i LOQ byly převzaty z diplomové práce Ing. Simony Wawroszové [72], která metodu validovala.

Výtěžnost

Výtěžnost byla stanovena metodou standardního přídávku ve třech koncentračních hladinách na 111,0–115,5 %, průměrně 114 %. Data byla převzata z diplomové práce [72].

Tabulka 22 Souhrnná tabulka validačních parametrů HPLC-MS

výtěžnost [%]	114
linearita – R²	0,9805
LOD [µg/l]	0,7
LOQ [µg/l]	2,3

4.1.2.2. Srovnání parametrů použité metody s dalšími metodami v literatuře

Tabulka 23 Srovnání některých validačních parametrů napříč literaturou v rámci stanovení deoxynivalenolu v pivě, X – neuvedeno

zdroj	metoda	přečištění	LOD (µg/l)	LOQ (µg/l)
[11]	LC-MS/MS	SPE	1	5
[24]	LC-MS/MS	Minimální	2,2	5,4
[56]	LC-MS/MS	IAC	X	1
[57]	UHPLC-HRMS	LLP	X	3
[58]	GC-MS	SPE	0,5	1,5
[62]	HPLC-UV	IAC	6	7
DP	LC-MS/MS	IAC	0,7	2,3

Tabulka č. 23 porovnává různé metody stanovení deoxynivalenolu v pivě, celá tabulka je uvedena v odstavci 2.6. Při srovnání parametrů metody HPLC-MS v této práci s dostupnou literaturou je vidět, že má použitá metoda velmi dobré meze detekce a kvantifikace. Oproti HPLC-UV jsou detekční limity mnohem nižší. Jednotlivé varianty přečištění vzorku se od sebe výrazně neliší. Metoda je tedy vhodná ke stanovení deoxynivalenolu v pivu.

4.1.2.3. Optimalizace extrakce deoxynivalenolu z piva

K optimalizaci extrakce deoxynivalenolu z piva byly vybrány dvě komerčně dostupné imunoafinitní kolonky, a to sice DONPREP® a 11+Myco MS-PREP® od firmy R-Biopharm. Přes každou kolonku byl přečištěn stejný vzorek ve třech opakováních. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce č. 24.

Tabulka 24 Koncentrace DON při použití různých imunoafinitních kolonek

měření	koncentrace DON [µg/l]	
	11+Myco MS-PREP	DONPREP
1	29,4	35,3
2	30,3	39,9
3	27,2	39,5
průměr	29,0	38,2

Průměrná koncentrace deoxynivalenolu při použití imunoafinitní kolonky 11+Myco MS-PREP® je o 9 µg/l nižší než při použití kolonky DONPREP®. Z tohoto důvodu by bylo možné říct, že v případě stanovení samotné koncentrace DON v pivu nejsou kolonky 11+Myco MS-PREP® tak vhodné, jako kolonky DONPREP®. Tento rozdíl může být způsoben zejména

tím, že kolonka 11+Myco MS-PREP® je určena ke stanovení více mykotoxinů v jediné analýze. Protilátky navázané v kolonce tak mohou být méně početné oproti protilátkám v kolonce DONPREP®, která je určena výhradně ke stanovení DON, to znamená, že kolonky 11+Myco MS-PREP® mají méně vazebných míst pro DON. Tyto kolonky jsou univerzální a předpokládá se tak jistý kompromis.

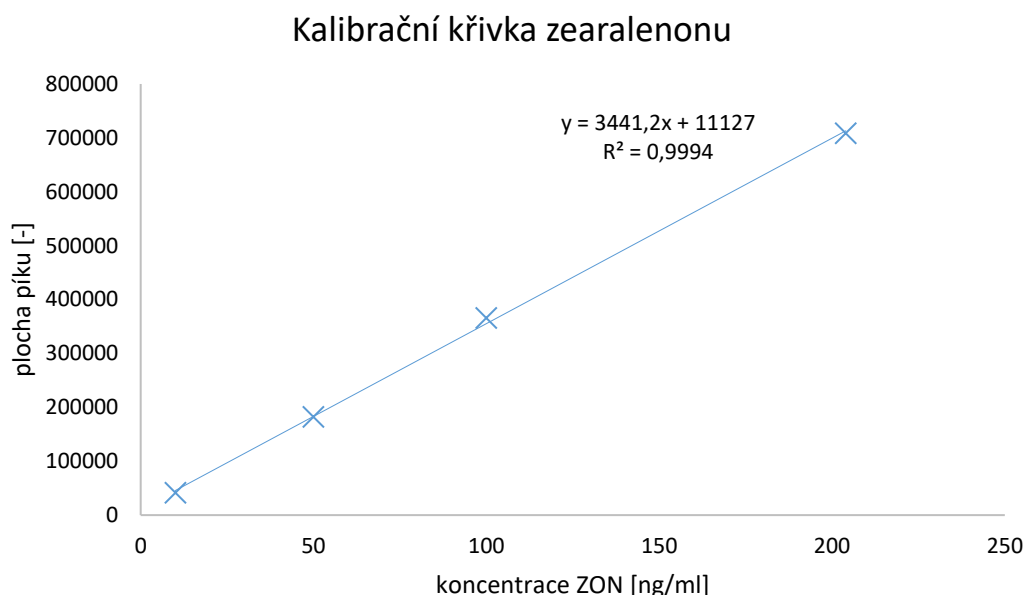
Z metodiky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského byla převzata relativní směrodatná odchylka 17 % pro metodu IAC-HPLC-MS za použití imunoafinitních kolonek DONPREP®. Po zohlednění nejistoty měření bylo zjištěno, že se intervaly hodnot obou získaných koncentrací DON překrývají. Nelze tak tvrdit, že kolonka 11+Myco MS-PREP® je méně vhodná ke stanovení DON, jelikož rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi deoxynivalenolu není statisticky významný. Naopak při analýze více mykotoxinů v jednom vzorku lze předpokládat výhodu ve výrazném snížení časové a finanční náročnosti metody při použití kolonek 11+Myco MS-PREP®. Z tabulky 24 dále vyplývá, že opakovatelnost měření je v obou případech velmi dobrá.

4.1.3. Zearalenon

4.1.3.1. Validace HPLC-MS

Linearita

Výsledné hodnoty proměřených standardů zearalenonu byly zpracovány do bodového grafu. Na obrázku níže je zobrazena ukázka kalibrační křivky.



Graf 7 Závislost plochy chromatografického píku na koncentraci ZON

Mez kvantifikace

Mez kvantifikace byla vypočítána jako desetinásobek poměru signálu a šumu získaných z chromatogramu a byla 0,25 µg/l. LOQ byla převzata z metodiky Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského.

4.2. Studium stability mykotoxinů v pivu

Následující podkapitoly se věnují stanovení koncentrace ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu chromatografickými technikami a ELISA. Pro tuto práci byl použit rozsáhlý soubor dat, který vznikl v průběhu osmi let. Jednalo se o piva, ve kterých byl v letech 2010–2018 ve Výzkumném ústavu pivovarském a sladařském naměřen zvýšený obsah některých ze sledovaných mykotoxinů. Cílem diplomové práce bylo znovu stanovit obsah vybraných mykotoxinů v pivech po uplynutí určitého času, srovnat jednotlivé metody stanovení mykotoxinů a posoudit stabilitu OTA a DON v čase ve vybraných skupinách piv. Během dvouletého výzkumu tak bylo získáno velké množství experimentálních dat a bylo úspěšně dosaženo všech vytyčených cílů.

4.2.1. Ochratoxin A v pivu

V této kapitole jsou prezentovány výsledky stanovení obsahu ochratoxinu A v pivech metodou UPLC-FLR a ELISA a jejich porovnání s literaturou, vzájemné srovnání těchto metod a posouzení stability OTA v pivě v závislosti na čase.

Obsah ochratoxinu A byl sledován v několika desítkách různých piv z evropských zemí. U 50 vzorků byla použita ELISA, u 65 vzorků pak metoda UPLC-FLR. 43 vzorků bylo analyzováno oběma metodami. Koncentrace ochratoxinu A v pivech byly mírně zvýšené ve srovnání s koncentracemi uvedenými v literatuře.

4.2.1.1. Monitoring obsahu ochratoxinu A v pivech

Při stanovení koncentrace OTA pomocí UPLC-FLR byl ochratoxin A obsažen v 94 % vzorcích v koncentraci od 1,1 ng/l do 610,9 ng/l. Nejnížší i nejvyšší koncentrace byla stanovena ve světlých ležácích. Průměrný obsah OTA v kontaminovaných vzorcích byl 39,41 ng/l, medián 12,9 ng/l byl nižší než průměr, to znamená, že většina vzorků byla kontaminována méně než je průměrná hodnota.

Ochratoxin A byl stanoven metodou ELISA v celkem 50 vzorcích uvedených v tabulce 25. Ochratoxin A v koncentraci vyšší než meze detekce byl obsažen v 14 % vzorcích v koncentraci od 51,0 ng/l do 678,7 ng/l. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u světlého bezlepkového ležáku, nejnižší u světlého ležáku. Průměrný obsah OTA v kontaminovaných vzorcích byl 265,4 ng/l, medián 163,6 ng/l byl nižší než průměr.

Tabulka 25 Vzorky určené k analýze OTA pomocí ELISA

druh piva	počet vzorků
světlý ležák	10
světlé	13
tmavé	4
světlé výčepní	8
bezlepkové nealkoholické	7
polotmavé	1
světlý bezlepkový ležák	4
bezlepkové tmavé	3

Tabulka 26 Přehled koncentrace ochratoxinu A napříč literaturou

zdroj	koncentrace OTA [ng/l]	průměr [ng/l]	incidence [%]
[33]	2–66	11	93
[58]	2–189	19	68
[10]	1–195	14–40	81
[49]	30–60	44	24
[51]	19–198	25	78
DP	1–611	39	94

Tabulka 26 ukazuje koncentraci ochratoxinu A v dostupné literatuře. Z tabulky je patrné, že incidence kontaminovaných vzorků je srovnatelná s literaturou. Maximální koncentrace ochratoxinu A v diplomové práci je vyšší než některé hodnoty v literatuře, jednalo se však o extrémní hodnotu. Průměr koncentrací je vyšší oproti některým hodnotám v literatuře, to může být způsobeno několika faktory. Výskyt ochratoxinu A v pivovarských surovinách je dán zejména nevhodným skladováním a klimatickými podmínkami vhodnými pro růst plísní a proto se může lišit napříč různými státy a roky výroby piva. Navíc převážná většina analyzovaných piv v této práci pochází z České republiky, kde se nepoužívají surogáty a extrakt původní mladiny může být vyšší oproti jiným zemím, teoreticky tak může být hladina mykotoxinů vyšší.

Tolerovatelný týdenní příjem OTA je 120 ng na kg tělesné hmotnosti. Pokud by tedy 80 kg člověk pil pivo s nejvyšší naměřenou koncentrací ochratoxinu A (678,7 ng/l), musel by vypít 4 piva denně, aby dosáhl tolerovatelného týdenního příjmu. Většina analyzovaných piv však obsahuje koncentrace kolem 12,9 ng/l, takže teoretické vypití 212 těchto piv denně lze považovat z hlediska obsahu OTA za bezpečné.

4.2.1.2. Srovnání použitých metod

V rámci diplomové práce byly srovnány dva analytické postupy stanovení ochratoxinu A v pivě. Oběma postupy byl analyzován obsah ochratoxinu A ve 43 vzorcích. Prvním z postupů je IAC-UPLC-FLR. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je podle řady autorů konfirmační technika ke stanovení nejen ochratoxinu A, ale i ostatních mykotoxinů. Meze detekce a kvantifikace jsou dostatečné pro stanovení OTA v pivě, jehož koncentrace se pohybuje v rozmezí 2–66 ng/l [33]. Podrobná příprava vzorku k analýze je popsána v odstavci 3.4.4. Přechištění vzorku přes imunoafinitní kolonky je jednoduché a časově nenáročné. V rámci validace bylo dosaženo výtěžnosti 102 % a dostatečné opakovatelnosti. Vzorky se nemusely ředit, jelikož maximální kapacita imunoafinitní kolonky OCHRAPREP® je 1200 ng ochratoxinu A. Přechištěním vzorku se zabránilo matričním efektům, které by zhoršily citlivost metody snížením analytického signálu.

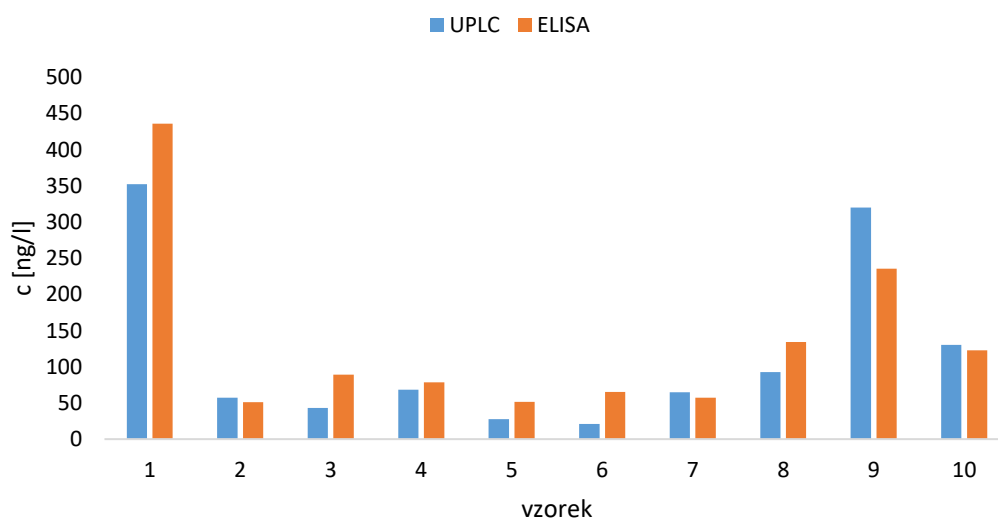
UPLC představuje v analýze OTA rychlou a spolehlivou techniku, kdy se retenční čas OTA pohybuje kolem 3 minut. Fluorescenční detektor zaručuje vysokou citlivost, přesnost a selektivitu.

Výše uvedená diskuse nad daným tématem ukazuje, že IAC-UPLC-FLR představuje výhodnou metodu ke stanovení ochratoxinu A v pивě. Jednoduchá příprava vzorku, adekvátní časová náročnost, dobrá citlivost, selektivita a výborná výtěžnost poukazují na vhodnost této metody k analýze ochratoxinu A. Jedinou nevýhodou je, že se vzrůstajícím počtem vzorků se zvyšuje jak časová, tak finanční náročnost, k čemuž nedochází u screeningových metod, např. u ELISA.

Co se týče stanovení ochratoxinu A v pивě pomocí ELISA, příprava vzorku byla mnohem náročnější ve srovnání s UPLC. Detailní postup je vypsán v odstavci 3.5.1. Značnou nevýhodou přípravy vzorku byla opakovaná extrakce OTA dichlormethanem a oddělování jednotlivých fází. Příprava byla složitá, vysoce časově náročná a vyžadovala enormní spotřebu spotřebního materiálu a skla. Postup zahrnoval několik kroků, čímž se zvyšovala šance udělat chybu. Dalším faktorem, který by hrál roli při potenciálním výběru této metody je vysoká cena kitu.

Limit kvantifikace (50 ng/l) byl mnohem vyšší než u UPLC (1 ng/l), což je však pochopitelné, vzhledem k tomu, že se jedná o screeningovou metodu. Koncentrace OTA u většiny vzorků se pohybovala pod mezí detekce. U vzorků s koncentrací vyšší než 50 ng/l, což představovalo 23 % vzorků, byly výsledky získané pomocí ELISA srovnatelné s UPLC. Srovnání je zobrazeno v grafu č. 8. Výrobce uvádí i možnou cross reaktivitu s ochratoxinem B a C, která však nebyla z výsledků patrná. Získané výsledky nejsou porovnatelné s literaturou, protože nejsou dostupné publikace, ve kterých by autor stanovoval OTA v pивu pomocí ELISA.

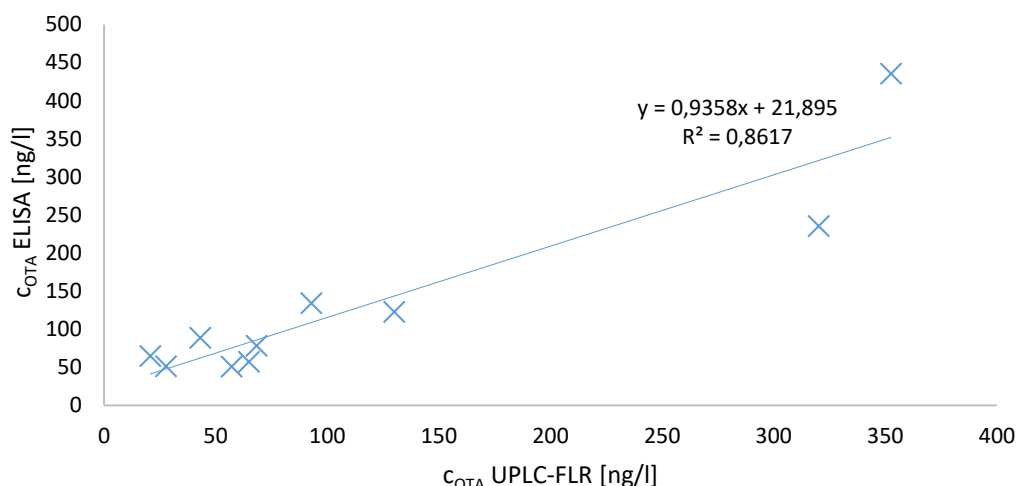
srovnání koncentrací OTA získaných ELISA a UPLC-FLR



Graf 8 Srovnání koncentrací ochratoxinu A získaných pomocí ELISA a UPLC-FLR

Ke zjištění korelace mezi oběma metodami byla výsledná data podrobena Shapiro-Wilkovu testu normality. Distribuce dat nebyla normální, protože p -hodnota byla menší než hladina významnosti 0,05. K posouzení korelace byl proto vybrán neparametrický Spearmanův koeficient pořadové korelace. Program STATISTICA vyhodnotil korelaci mezi koncentracemi ochratoxinu A získanými kapalinovou chromatografií a ELISA jako statisticky významnou. Korelační koeficient se rovnal 0,79, což značí silnou korelaci mezi oběma sadami dat. Tento výsledek potvrzuje předchozí tvrzení, že jsou výsledky obou metod srovnatelné.

Závislost koncentrace OTA získaná ELISA oproti koncentraci z UPLC-FLR



Graf 9 Vzájemná závislost koncentrací ochratoxinu A získaných ELISA a UPLC-FLR

Ačkoliv jsou výsledky získané ELISA přesné a odpovídají výsledkům získaných kapalinovou chromatografií, nelze metodu pro rutinní stanovení OTA v pивě doporučit vzhledem k náročné a zdlouhavé přípravě vzorku a vysoké mezi detekce. Pomocí kitu RIDASCREEN® Ochratoxin A lze stanovit OTA rovněž v obilovinách a krmivech, kde by příprava mohla být o něco jednodušší [64].

4.2.1.3. Posouzení stability ochratoxinu A v čase

K posouzení závislosti koncentrace ochratoxinu A na čase bylo vybráno celkem 43 vzorků pив. Obsah OTA byl analyzován pomocí kapalinové chromatografie ve dvou měřeních s dostatečným časovým odstupem. Koncentrace ochratoxinu A z druhého měření v čase t (c_2) byla odečtena od koncentrace ochratoxinu A z prvního měření v čase nula (c_1), rozdíl koncentrací (Δc) byl srovnáván s rozdílem času jednotlivých měření (Δt). Deskriptivní statistika je uvedena v tabulce níže. Vzhledem k fyzikálně chemickým vlastnostem ochratoxinu A byla očekávaným výsledkem pozorování konstantní, případně snižující se koncentrace ochratoxinu A v čase.

Tabulka 27 Deskriptivní statistika;
koncentrace OTA v prvním (c_1) a druhém (c_2) měření, rozdíl koncentrací (Δc), rozdíl času mezi jednotlivými měřeními (Δt)

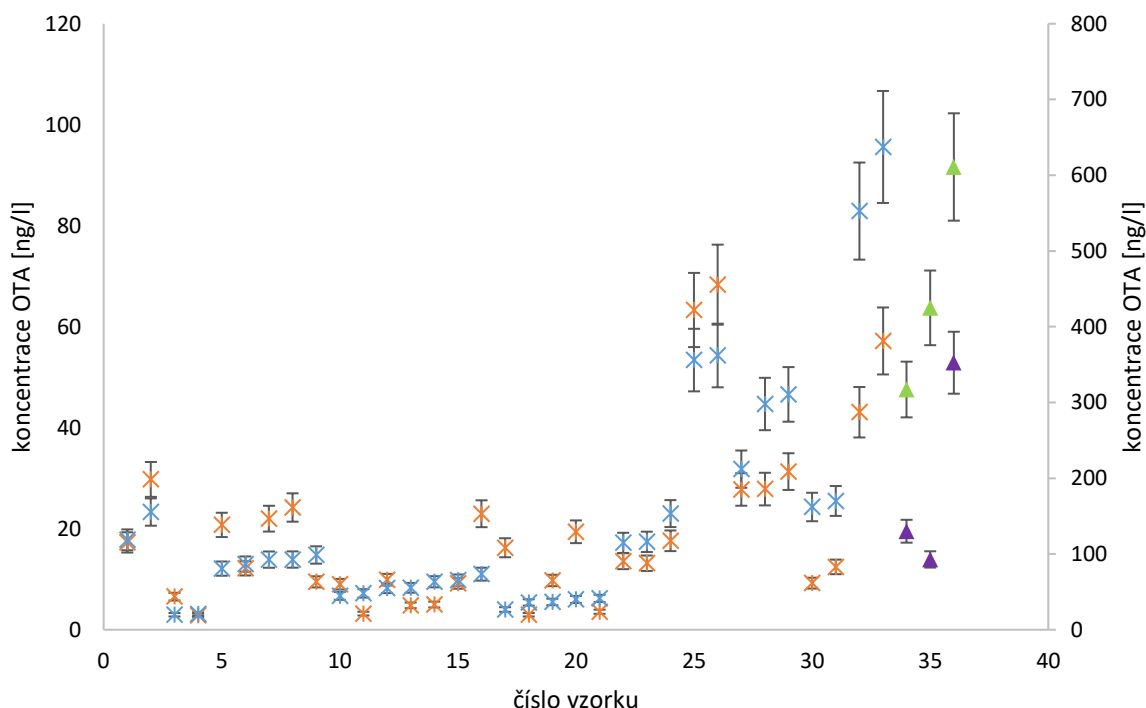
	počet vzorků	průměr	medián	minimum	maximum
c_1 [ng/l]	36	57,56	14,35	3,0	610,9
c_2 [ng/l]	36	33,95	16,76	2,9	352,5
Δt [dny]	36	840,25	271,50	84,0	3446,0
Δc [ng/l]	36	23,61	2,54	-14,0	332,1

Z celkových 43 vzorků byla koncentrace ochratoxinu A pod mezí detekce u pěti z nich. Po provedení neparametrického Dean-Dixonova testu bylo nalezeno devět odlehlých hodnot, které

by zvýšily odchylku a ovlivnily statistické zpracování. Ve výsledku tak byly některé odlehlé hodnoty odstraněny a konečná sada dat se skládala ze 36 piv.

Z průměrů koncentrace OTA v čase nula a koncentrace OTA v čase t , stejně tak jako z rozdílu maximálních hodnot koncentrací, je vidět snížení obsahu mykotoxinu v čase. Medián se však nemění a tak toto tvrzení nelze považovat za správné. Průměrná doba mezi měřeními byla více než 2 roky, nicméně u mnoha vzorků to bylo méně.

Zobrazení jednotlivých koncentrací OTA ve vzorcích piva

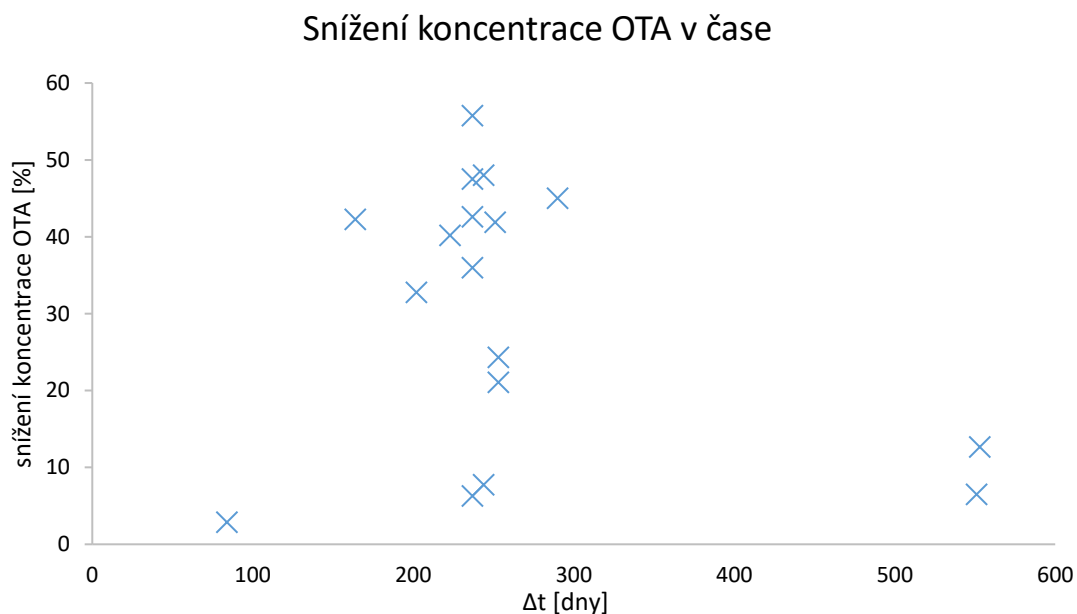


Graf 10 Koncentrace ochratoxinu A s chybovými úsečkami; zelená a modrá barva odpovídají koncentraci OTA v čase nula, fialová a oranžová barva odpovídají koncentraci v čase t; zelené a fialové trojúhelníky odpovídají ose vpravo, modré a oranžové kříže odpovídají ose vlevo

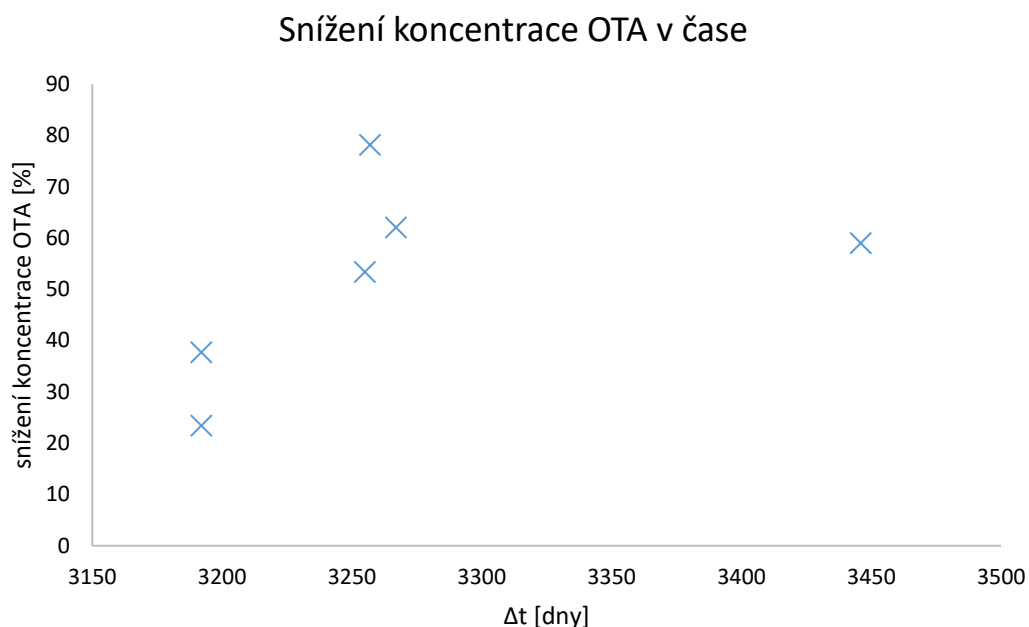
Přehled rozdílů jednotlivých koncentrací OTA je zobrazen na grafu 10. Po započítání relativní směrodatné odchylky měření 11,61 % bylo pozorováno snížení koncentrace s časem u 47 % vzorků a zvýšení koncentrace u 28 % vzorků. Rozdíly koncentrací u zbylých dat nebyly statisticky významné. Průměrně se koncentrace OTA snižovala o 36 %.

Snížení koncentrace mohla způsobit například přeměna ochratoxinu A na jiný metabolit, adsorpce na vysrážený pивní kámen nebo na koloidní zákal, který se u některých vzorků vyskytoval. Další možností je adsorpce ochratoxinu A na sklo. Ke zvýšení koncentrace mohl vést rozpad některého metabolitu ochratoxinu A nebo rozpad komplexů mykotoxinu s taniny, polyfenoly, α -hořkými kyselinami či jinými sloučeninami. U vzorků, u kterých byl rozdíl koncentrací s časem statisticky nevýznamný, lze považovat koncentraci OTA v čase za stabilní. Uvedená tvrzení a výsledky nelze porovnat s literaturou, protože nejsou dostupné publikace, ve kterých by se autor věnoval stanovení závislosti koncentrace OTA v čase.

V následujících grafech jsou vybrány vzorky, u kterých se koncentrace ochratoxinu A s časem snižovala. Z grafů je patrná jednak nenormální distribuce dat, jednak absence jakéhokoliv trendu snížení koncentrace OTA v čase. U starších piv docházelo k většímu snížení koncentrace OTA oproti pivům, kde rozdíl doby mezi měřeními nebyl tak velký.



Graf 11 Závislost snížení koncentrace ochratoxinu A na čase



Graf 12 Závislost snížení koncentrace ochratoxinu A na čase

Lineární závislost změny koncentrace OTA na čase se v jednoduchém bodovém grafu neprokázala, proto byla zjišťována korelace mezi jednotlivými veličinami. Po použití Shapirova-Wilkova testu normality se ukázalo, že distribuce dat nebyla normální, protože

p -hodnota byla menší než hladina významnosti. Nebylo tedy možné porovnat Δc a Δt pomocí párového t -testu. Následně bylo zjištěno, že rozdíl koncentrací OTA s rozdílem času jednotlivých měření nekoreluje.

Po rozdělení dat do tří kategorií podle počátečních koncentrací ochratoxinu A a to sice na interval koncentrací 1–10 ng/l, 11–50 ng/l a 50 a více ng/l ochratoxinu A nebyla prokázána korelace mezi změnou koncentrace v čase ani v jedné z těchto kategorií.

Vzhledem k tomu, že spolu Δc a Δt jako celek, ani při rozdělení podle koncentračních hladin nesouvisí, byla hledána souvislost mezi změnou koncentrace v čase s dalšími vlastnostmi piva, např. stupňovitostí nebo obsahem alkoholu. Tabulka 28 ukazuje tyto závislosti.

Tabulka 28 Souhrnná tabulka korelací rozdílu koncentrace OTA s časem u rozdělní dat podle různých parametrů

dělení vzorků	Spearmanův korelační koeficient
všechny vzorky	
rozdíl času	0,10
obsah alkoholu	-0,20
stupňovitost	-0,13
typ piva	
polotmavé	0,20
světlé	-0,39
světlý ležák	-0,38
světlé výčepní	0,16
tmavé	0,69
počáteční koncentrace [ng/l]	
1–10	-0,40
11–50	0,41
50 a více	0,11

Ze všech výsledků je patrné, že změna koncentrace OTA s časem nezávisí na počáteční koncentraci, délce časového intervalu, druhu piva, obsahu alkoholu a potažmo i množství extrahovatelných látek. Jediná slabá, ale statisticky signifikantní korelace mezi Δc a Δt byla nalezena u tmavých piv. Závěrem lze tedy konstatovat, že ke změnám koncentrace OTA v čase dochází, ale tyto změny nemají žádný trend. Výsledky prokazují, že závislost změny koncentrace OTA v čase je ovlivněna více faktory a je třeba věnovat této problematice další úsilí.

4.2.2. Deoxynivalenol v pivu

V této kapitole jsou prezentovány výsledky stanovení obsahu deoxynivalenolu v pivech metodou HPLC-MS a ELISA a jejich porovnání s literaturou, vzájemné srovnání těchto metod a posouzení stability DON v pivě v závislosti na čase.

Obsah deoxynivalenolu byl sledován v několika desítkách vzorcích různých druhů piv. U 59 vzorků byla použita HPLC-MS, u 72 vzorků ELISA. 18 vzorků bylo analyzováno oběma metodami. Koncentrace DON v pivech byly až na pár výjimek relativně nízké.

4.2.2.1. Monitoring obsahu deoxynivalenolu v pivech

Při stanovení koncentrace DON pomocí HPLC-MS byl deoxynivalenol obsažen v 86 % vzorcích v koncentraci od 1,04 µg/l do 90,90 µg/l. Nejnižší koncentrace DON byla nalezena ve světlém ležáku a nejvyšší koncentrace rovněž ve světlém ležáku. Průměrný obsah DON v kontaminovaných vzorcích byl 9,86 µg/l, medián 4,70 µg/l byl poloviční oproti průměru. Naměřené hodnoty se shodovaly s literaturou. V článku [49] se deoxynivalenol s deoxynivalenolem-3-glukosidem vyskytoval v koncentracích pod 10 µg/l v 60 % případů. Většina vzorků s vyšší kontaminací byla řemeslná piva. V další studii [31] se deoxynivalenol vyskytoval v 64 % vzorcích v průměrné koncentraci 5,18 µg/l. Jiná studie [55] s evropskými pivy ukazuje koncentrace DON v rozmezí 4,0–56,7 µg/l, s průměrnou hodnotou 13,5 µg/l.

Deoxynivalenol byl stanoven metodou ELISA celkem v 72 vzorcích uvedených v tabulce 29. Deoxynivalenol byl obsažen ve všech vzorcích v koncentraci od 4,43 µg/l do 93,98 µg/l. Nejnižší koncentrace byla stanovena v bezlepkovém nealkoholickém pivu. Nejvyšší koncentrace byla ve tmavém ležáku. Průměrný obsah DON v kontaminovaných vzorcích byl 22,18 µg/l, medián 17,58 µg/l se relativně shodoval s průměrem.

Tabulka 29 Vzorky určené k analýze deoxynivalenolu pomocí ELISA

druh piva	počet vzorků
světlý ležák	17
světlé	13
tmavé	13
světlé výčepní	10
bezlepkové nealkoholické	7
polotmavé	5
světlý bezlepkový ležák	4
bezlepkové tmavé	3

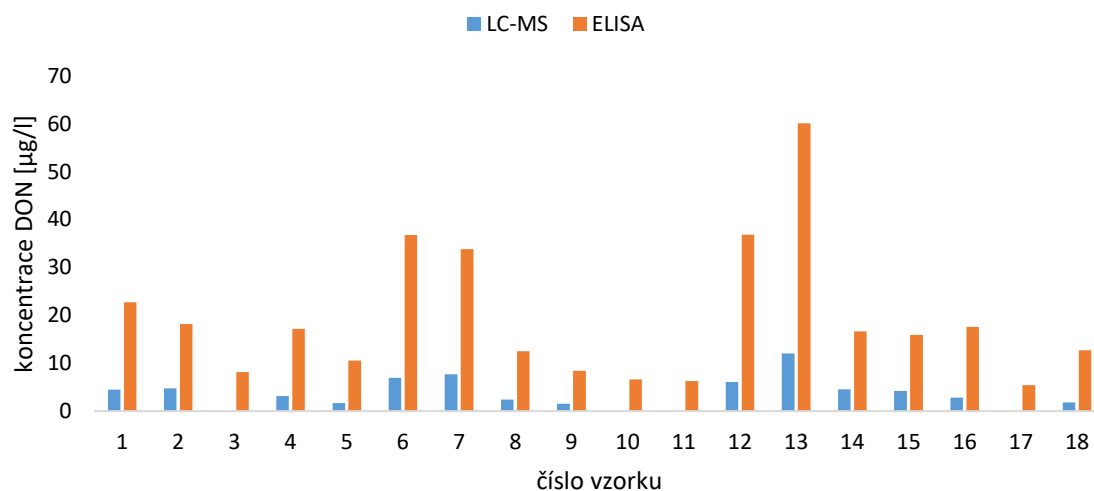
TDI je pro deoxynivalenol stanoven na 1 µg na kg tělesné hmotnosti. Osobě vážící 80 kg, která by pila pivo s nejvyšší naměřenou koncentrací deoxynivalenolu (93,98 µg/l), by stačilo vypít méně než dvě tato piva, aby dosáhla tolerovatelného denního příjmu. Většina piv analyzovaných HPLC-MS však obsahuje koncentrace kolem 4,70 µg/l, takže vypití 17 těchto piv lze považovat z hlediska obsahu deoxynivalenolu za bezpečné.

4.2.2.2. Srovnání použitých metod

V dnešní době existují dvě nejčastěji používané metody ke stanovení deoxynivalenolu v pivě. Pro získání přesných výsledků se využívá HPLC-MS, kdežto pro rychlé a jednoduché stanovení koncentrace DON se dává přednost ELISA. Nevýhodou ELISA je však reaktivita protilátek nejen s deoxynivalenolem, ale i jeho různými metabolity, která vede k falešně pozitivním výsledkům.

K porovnání metod určených ke stanovení deoxynivalenolu v pivě bylo vybráno celkem 18 vzorků piv z různých zemí, různého typu a odlišné stupňovitosti. Výsledné koncentrace deoxynivalenolu získané pomocí HPLC-MS a ELISA jsou zobrazeny v následujícím grafu.

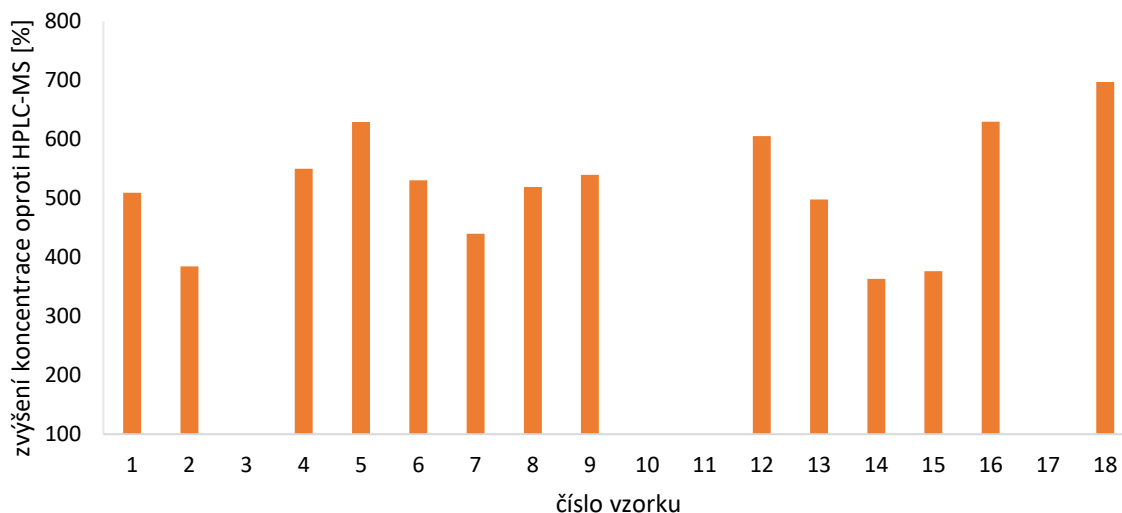
rovnání koncentrací DON získaných HPLC-MS a ELISA



Graf 13 Srovnání koncentrací deoxynivalenolu získaných pomocí HPLC-MS a ELISA

Z grafu č. 13 je patrné, že všechny hodnoty koncentrací deoxynivalenolu získaných pomocí ELISA jsou nadhodnocené, v jednom případě je koncentrace deoxynivalenolu až 7x vyšší oproti koncentraci naměřené kapalinovou chromatografií. Výsledky se shodují s mnoha dalšími studiemi [31, 55, 61], které rovněž uvádí nadhodnocení výsledků při použití ELISA.

poměr koncentrací DON získaných ELISA a HPLC-MS



Graf 14 Nadhodnocení koncentrací DON získaných metodou ELISA

V grafu č. 14 bylo nadhodnocení koncentrace deoxynivalenolu metodou ELISA převedeno na jednotky procent, přičemž koncentrace získaná kapalinovou chromatografií jako referenční metodou představuje 100 %. Vzorky 3, 10, 11 a 17 měli koncentraci DON v rámci stanovení HPLC-MS nižší než LOQ. K nejvyššímu nadhodnocení výsledků došlo u vzorku 18, a to sice o 697 %. Nejnižší nadhodnocení představovalo 363 % u vzorku č. 14. Průměrné nadhodnocení výsledků činí 519 %, medián je 525 %.

ELISA slouží zejména jako screeningová metoda ke stanovení deoxynivalenolu, z tohoto důvodu může být méně přesná oproti HPLC-MS. Důvodem naměření vyšších koncentrací DON v případě ELISA může být jednak cross reaktivita s metabolity deoxynivalenolu, jednak minimální úprava vzorku, tudíž možné interakce protilátek se zbytky matrice, případně absorpce záření zbytky matrice. Pravdivost posledního tvrzení dokazují následující výsledky. Průměrná koncentrace DON u tmavých a polotmavých pív byla 37,25 µg/l, kdežto u světlých pív pak 16,14 µg/l. Je tedy možné, že některé barevné látky u tmavých pív interferovaly se spektrofotometrickým stanovením DON. Průměry koncentrací DON získané HPLC-MS se u tmavých a světlých pív téměř shodují (11,8 µg/l u tmavých a 9,3 µg/l u světlých pív).

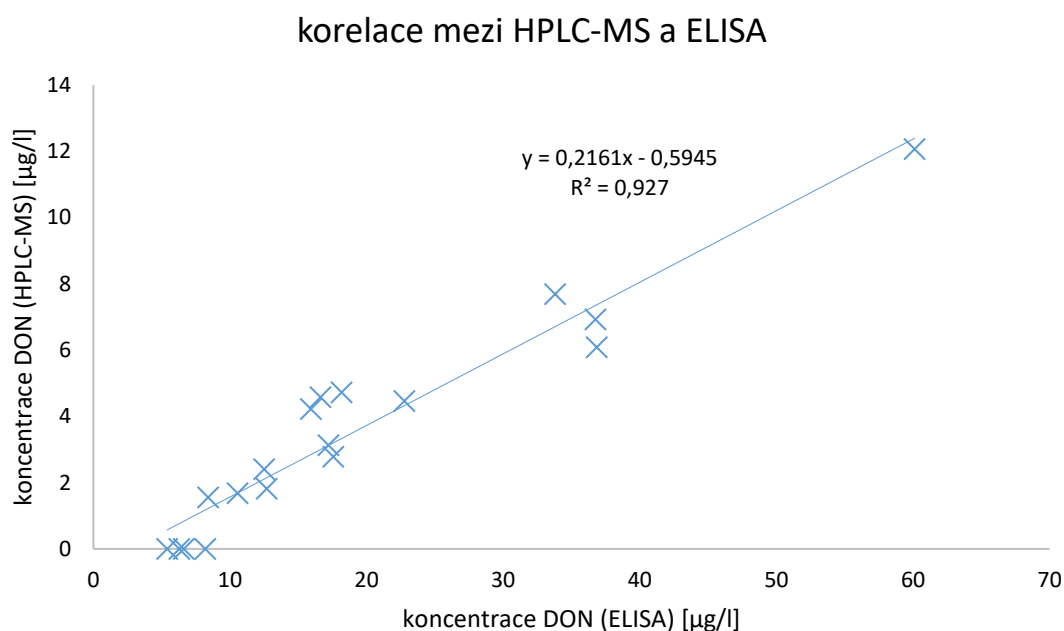
Manuál ELISA kitu [65] uvádí možnou reakci protilátek s 3-acetyldeoxynivalenolem (3-ADON), 15-acetyldeoxynivalenolem (15-ADON) a nivalenolem. Výtěžnost 3-acetyldeoxynivalenolu je pak vyšší než 100 %, což může vysvětlovat vysoké hodnoty koncentrace deoxynivalenolu. Studie [61], kde použili piva spikovaná 3-ADON, navíc uvádí, že při použití kitu RIDASCREEN® DON byla cross reaktivita s 3-acetyldeoxynivalenolem 3x vyšší, než uvádí brožura výrobce. Jelikož jsou však koncentrace acetylovaných forem DON v obilovinách nízké [24, 61] je to hlavně deoxynivalenol-3-glukosid, který přispívá k falešně pozitivním výsledkům [61]. Je také možné, že reagují i další, zatím neznámé metabolity deoxynivalenolu.

V rámci studie [31] byl porovnán součet koncentrací DON, D3G a ADON získaných HPLC-MS/MS s koncentrací deoxynivalenolu získanou pomocí ELISA. Součet všech tří koncentrací deoxynivalenolu a jeho derivátů relativně odpovídal koncentraci DON stanovené pomocí ELISA. Tento poznatek tak potvrzuje, že k nadhodnocení výsledků dochází právě kvůli interakci protilátek s dalšími metabolity deoxynivalenolu.

Výše uvedené výsledky vedou k závěru, že ELISA je metoda vhodná jako screeningová, ale nelze ji doporučit ke kvantifikaci. Příprava vzorku byla velmi rychlá a jednoduchá, celkové stanovení koncentrace deoxynivalenolu bylo oproti stanovení HPLC-MS snadné a prosté. Oproti HPLC-MS ELISA sice nedosahovala takové přesnosti a výtěžnosti, nicméně výsledky byly adekvátní k rychlosti a jednoduchosti metody. Celkově měla ELISA vyšší detekční limit a horší specifitu. Výsledky získané touto metodou by měly být vždy potvrzeny instrumentální technikou. Výhodou cross reaktivity protilátek s metabolity deoxynivalenolu je, že touto analýzou získáme přehled o celkovém množství deoxynivalenolu a jeho metabolitů ve vzorcích pív.

HPLC-MS je nejčastěji používanou referenční metodou ke stanovení deoxynivalenolu a jeho metabolitů. Spojení IAC-HPLC-MS je více přesné a specifitější než ELISA. Výtěžnost 114 % u HPLC-MS je vyšší než u ELISA (80–110 %) a meze detekce a kvantifikace jsou u HPLC-MS nižší. Nevýhodou HPLC-MS je větší časová náročnost, protože je nutné připravovat každý vzorek zvlášť. Na trhu se však již objevují imunoafinitní kolony, jako například 11+Myco MS-PREP®, které by tento problém mohly vyřešit, jelikož umožňují extrakci více mykotoxinů v jednom kroku. S větším počtem vzorků rovněž vzrůstá finanční náročnost metody, oproti ELISA, která je při větším počtu vzorků výhodnější.

Ke zjištění korelace mezi oběma metodami bylo nejdříve testováno rozdělení dat Shapiro-Wilkovým testem normality. Distribuce dat nebyla normální, protože p -hodnota byla menší než zvolená hladina významnosti 0,05. K posouzení korelace byl proto vybrán neparametrický Spearmanův korelační koeficient. Program STATISTICA vyhodnotil korelaci mezi koncentracemi deoxynivalenolu získanými HPLC-MS a ELISA jako statisticky významnou. Korelační koeficient se rovnal 0,96, což značí velmi silnou korelaci mezi oběma sadami dat.

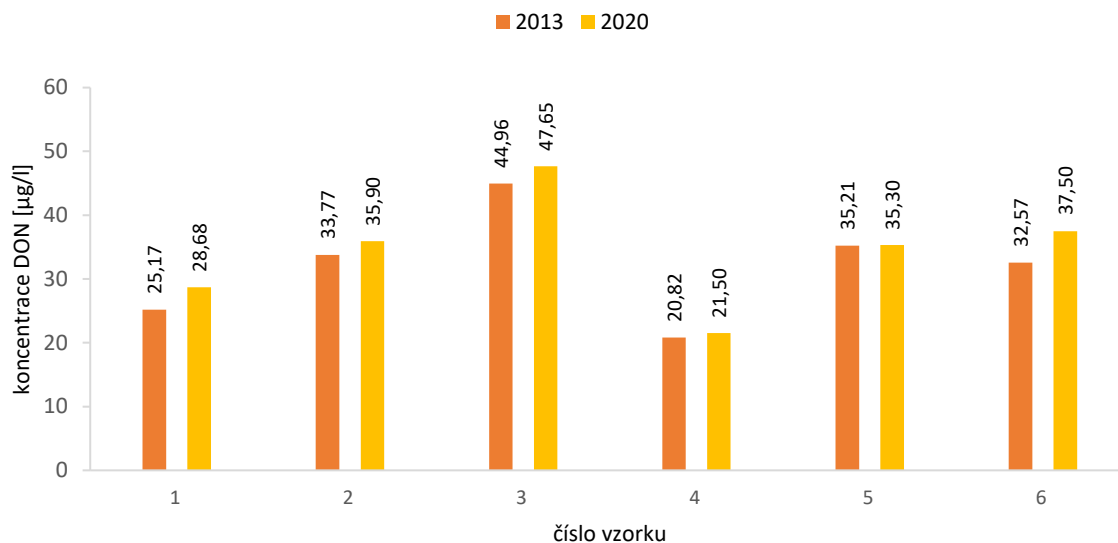


Graf 15 Korelace koncentrace DON mezi HPLC-MS a ELISA

4.2.2.3. Posouzení stability deoxynivalenolu v čase

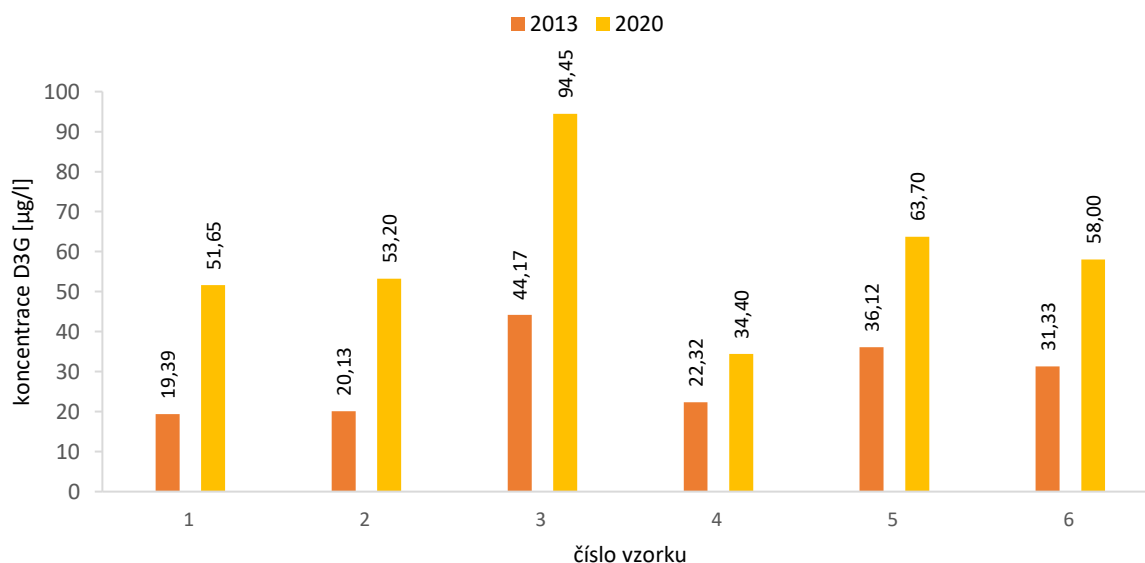
Ke sledování závislosti koncentrace deoxynivalenolu na čase bylo zvoleno celkem šest vzorků piv zobrazených v grafu č. 16. U všech vzorků byla koncentrace DON stanovena HPLC-MS. Z výsledků je patrné, že se koncentrace deoxynivalenolu s časem nemění, jak se dalo předpokládat, na základě jeho fyzikálně chemických vlastnostech. Koncentrace deoxynivalenol-3-glukosidu se s časem přibližně dvojnásobně zvyšuje, jak je patrné z grafu č. 17.

Srovnání koncentrace DON v letech 2013 a 2020



Graf 16 Porovnání koncentrace deoxynivalenolu v šesti různých pivech v rozmezí sedmi let

Srovnání koncentrace D3G v letech 2013 a 2020



Graf 17 Porovnání koncentrace deoxynivalenol-3-glukosidu v šesti různých pivech v rozmezí sedmi let

Z grafu 16 je vidět, že se koncentrace deoxynivalenolu v čase nemění, jak bylo předpokládáno na základě poznatků z literatury [3, 4], kde je deoxynivalenol označován jako stabilní látka. Jelikož ke stabilitě deoxynivalenolu v čase ve vzorcích piva není dostupná žádná literatura, získané výsledky nelze srovnat s prací dalších autorů.

Graf č. 17 znázorňuje zvýšení koncentrace deoxynivalenol-3-glukosidu průměrně o dvojnásobek oproti původní hodnotě. O stabilitě D3G zatím není známo mnoho informací a je tedy těžké posoudit chování D3G v čase. Je možné, že je zvýšení koncentrace způsobeno rozpadem jiných metabolitů deoxynivalenolu, například di- a triglykosidů.

4.2.3. Zearalenon v pivu

V této kapitole jsou prezentovány výsledky stanovení obsahu zearalenonu v pivech metodou HPLC-MS a ELISA, jejich porovnání s literaturou a vzájemné srovnání těchto metod.

Obsah zearalenonu byl sledován celkem v 93 vzorcích pív. U 71 vzorků byla použita ELISA, u zbývajících vzorků HPLC-MS. 12 vzorků bylo analyzováno oběma metodami. Koncentrace ZON byly velmi nízké a všechny výsledky se shodovaly s literaturou.

4.2.3.1. Monitoring obsahu zearalenonu v pivech

Výskyt zearalenonu v evropských pivech nebyl očekáván, jelikož několik málo článků, které se zabývají zearalenonem v pivě uvádí žádné nebo velmi nízké koncentrace tohoto mykotoxinu [49, 68]. Toto tvrzení bylo potvrzeno HPLC-MS, kdy se zearalenon nevyskytoval v žádném vzorku. Při stanovení obsahu zearalenonu metodou ELISA se sice tento mykotoxin vyskytoval v 73 % vzorků, jenže tyto koncentrace jsou způsobeny nízkou selektivitou metody a nadhodnocením výsledků způsobené reakcí s metabolity zearalenonu. Tyto jevy jsou diskutovány v další kapitole.

Zearalenon byl při stanovení ELISA obsažen v 73 % vzorcích. Nejvyšší koncentrace byla 0,96 µg/l u polotmavého piva. Nejnižší koncentrace 0,25 µg/l byla stanovena u dvou světlých ležáků. Průměrný obsah ZON v kontaminovaných vzorcích byl 0,42 µg/l, medián 0,38 µg/l. Přehled vzorků uvádí tabulka 30.

Tabulka 30 Vzorky ke stanovení ZON

druh piva	počet vzorků
světlý ležák	16
světlé	13
tmavé	13
světlé výčepní	10
bezlepkové nealkoholické	7
polotmavé	5
světlý bezlepkový ležák	4
bezlepkové tmavé	3

Při srovnání naměřených hodnot koncentrací zearalenonu s polskými vzorky ze studie [68], kde se ZON vyskytoval v 11 % vzorcích o průměrné koncentraci 0,044 µg/l, bylo zjištěno, že incidence a obsah ZON v pivech v diplomové práci je mnohem vyšší. Na tento fakt poukazuje i další článek [49], kde se ZON vyskytoval v jediném vzorku z tisíce a to sice v koncentraci 0,3 µg/l. Zvýšená koncentrace zearalenonu v pivech analyzovaných v této práci může být způsobena hlavně méně přesnou screeningovou metodou, jelikož při confirmaci těchto výsledků se nepotvrdil výskyt zearalenonu v žádném pivě.

Předběžný tolerovatelný denní příjem je u zearalenonu 0,2 µg na kg tělesné hmotnosti. V případě, že by se 80 kg člověk rozhodl pít pivo s nejvyšší naměřenou koncentrací zearalenonu (0,72 µg/l), musel by vypít více než 44 piv, aby dosáhl t-TDI.

4.2.3.2. Srovnání použitých metod

K porovnání metod určených ke stanovení zearalenonu v pivě bylo vybráno celkem 12 vzorků piv. Výsledné koncentrace zearalenonu získané pomocí HPLC-MS a ELISA jsou zobrazeny v následující tabulce.

Tabulka 31 Koncentrace zearalenonu v pivech stanovená za pomoci HPLC-MS a ELISA

č. vzorku	LC-MS [µg/l]	ELISA [µg/l]
1	<0,25	<0,25
2	<0,25	0,44
3	<0,25	0,27
4	<0,25	0,43
5	<0,25	<0,25
6	<0,25	<0,25
7	<0,25	<0,25
8	<0,25	<0,25
9	<0,25	<0,25
10	<0,25	0,72
11	<0,25	<0,25
12	<0,25	0,29

Z tabulky je patrné, že koncentrace zearalenonu ve většině vybraných pivech byla pod mezi kvantifikace obou zvolených metod. Koncentrace zearalenonu, které jsou vyšší než meze kvantifikace, jsou velmi nízké. Tento výsledek se shoduje s literaturou [49], kde se koncentrace zearalenonu pohybovaly, až na jeden případ, pod limitem detekce 0,3 µg/l. V polských pivech [68] byl zearalenon nalezen pouze v 11 % případů v koncentraci do 0,55 µg/l. Obecně se zearalenon v evropských pivech nevyskytuje ve vysokých koncentracích a existuje pouze velmi omezený počet studií, ve kterých byl obsah zearalenonu v pivech stanoven.

Co se týče srovnání obou použitých metod, ELISA zahrnovala velmi jednoduchou a rychlou přípravu vzorku a jednoduché vyhodnocení dat. Ačkoliv byla výtěžnost podle výrobce 80 %, z tabulky č. 31 je patrné, že tato metoda výsledky nadhodnocuje. To je způsobeno reakcemi protilátek s metabolity zearalenonu, např. α-zearalenolem, β-zearalenolem a zeranolem. Podle výrobce kitu [66] může docházet ke cross reaktivitě s těmito metabolity. Obsah α-zearalenolu může ovlivnit výslednou koncentraci zearalenonu až o 42 %, obsah β-zearalenolu o 14 % a zeranolu o 28 %. Z tohoto hlediska je tedy kit RIDASCREEN® Zearalenon vhodný pouze jako screeningová metoda, přičemž se výsledky musí potvrdit instrumentálními technikami.

Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem je druhou alternativou ke stanovení ZON v pivě. Příprava vzorku byla náročnější než u ELISA, zahrnovala přečištění přes imunoafinitní kolonku, eluci zearalenonu organickým rozpouštědlem, odpaření a rozpuštění zearalenonu v methanolu. Celková časová náročnost techniky byla mnohem větší

než u ELISA, nicméně poskytovala přesnější výsledky, které oproti ELISA nebyly falešně pozitivní. Limit kvantifikace se shodoval u obou metod. HPLC-MS se používá ke confirmaci výsledků získaných pomocí ELISA nejen v případě zearalenonu [49].

Oproti stanovení deoxynivalenolu metodou ELISA neměli barevné látky v tmavých pivech na stanovení žádný vliv. Koncentrace ZON vyšší než LOQ byla stanovena u dvou světlých, dvou světlých výčepních a jednom polotmavém pive.

4.2.4. Společný výskyt sledovaných mykotoxinů v pivech

K porovnání závislosti jednotlivých mykotoxinů mezi sebou bylo vybráno 59 vzorků. Koncentrace OTA, DON a ZON byly ve všech případech stanoveny instrumentální technikou. Cílem srovnání koncentrací mykotoxinů v pivě je především zjištění, zda se vyskytují spolu a zdali se navzájem ovlivňují.

Zearalenon nebyl obsažen v žádném vzorku, a byl proto z porovnání vyřazen. Z celkového počtu 59 vzorků se ochratoxin A a deoxynivalenol vyskytovaly současně v 80 % případů. Ke zjištění korelace mezi koncentrací OTA a DON byl použit Spearmanův korelační koeficient, který byl 0,1, což znamená, že koncentrace vybraných mykotoxinů spolu nekorelují a nezávisí na sobě.

Je patrné, že se oba mykotoxiny spolu vyskytují, nicméně producent a podmínky biosyntézy obou mykotoxinů jsou odlišné a navzájem se tedy tyto mykotoxiny neovlivňují. Z výsledků tedy není možné říct, že pivo s vysokou koncentrací jednoho mykotoxinu obsahuje i vysokou koncentraci druhého mykotoxinu.

5. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla řešena problematika výskytu mykotoxinů v pivech. Cílem práce bylo posoudit stabilitu vybraných mykotoxinů (ochratoxinu A a deoxynivalenolu) v pivech v závislosti na čase, optimalizovat extrakci deoxynivalenolu z piva a stanovit koncentrace ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu v pivech.

Náplní literární rešerše byla charakterizace vybraných mykotoxinů, jejich výskyt a změny v rámci pivovarské technologie, metody prevence kontaminace mykotoxiny, legislativní ošetření této problematiky a možnosti analýzy mykotoxinů.

K analýze mykotoxinů byla vybrána zejména piva světlá, výčepní, ležáky, polotmavá a tmavá a také několik bezlepkových a nealkoholických piv z několika evropských zemí. Monitoring obsahu ochratoxinu A, deoxynivalenolu a zearalenonu ukázal, že se tyto mykotoxiny v pivech vyskytují v relativně malých množstvích a jejich koncentrace nepřekračují doporučené limity denního příjmu. Získané výsledky odpovídají české i zahraniční literatuře.

Validace metod IAC-UPLC-FLR a IAC-HPLC-MS ukázala, že jsou tyto metody vhodné ke stanovení ochratoxinu A, deoxynivalenolu i zearalenonu. Detekční limity u všech metod byly nízké, výtěžnost u UPLC-FLR byla vysoká a opakovatelnost byla velmi dobrá. Validací parametry u jednotlivých metod byly srovnány s literaturou, kdy v některých případech bylo dosaženo lepších výsledků než uvádí autoři. Provedena byla taktéž optimalizace extrakce deoxynivalenolu pomocí různých typů imunoafinitních kolonek, kdy se nejvíce osvědčila kolonka DONPREP® od firmy R-Biopharm.

Srovnání instrumentálních technik s imunochemickou metodou ELISA poukázalo na výhody a nevýhody této screeningové techniky. Stanovení ochratoxinu A touto metodou bylo zdoluhavé a detekční limit byl příliš vysoký na stanovení běžných koncentrací OTA v pivě. Výsledky však byly přesné a odpovídaly instrumentální technice UPLC-FLR. Metoda ELISA se ve smyslu kvantifikace příliš neosvědčila při stanovení deoxynivalenolu, kde docházelo k nadhodnocení výsledků. Příčinou nadhodnocení byla zřejmě reakce protilátek s deoxynivalenol-3-glukosidem a jinými metabolity DON. Na druhou stranu může tato metoda poskytovat celkový přehled o výskytu DON a jeho metabolitů ve vzorku. Zearalenon byl metodou ELISA stanoven v 73 % vzorků, kdežto pomocí HPLC-MS nebyl mykotoxin stanoven ani v jednom vzorku. Nadhodnocení výsledků je přičítáno reakcím protilátek s metabolity zearalenonu. Stanovení DON a ZON ELISA bylo oproti analýze OTA jednoduché a časově nenáročné a výsledky tomu odpovídaly. Tyto metody jsou vhodné pouze jako screeningové a výsledky je nutné ověřit instrumentální technikou.

Hlavním cílem práce bylo posoudit stabilitu ochratoxinu A a deoxynivalenolu v pivě v závislosti na čase. Získané výsledky ukazují, že ke změnám koncentrace ochratoxinu A v čase dochází, nicméně tyto změny nemají žádný trend. Celkově došlo ke snížení koncentrace u 47 % vzorků a ke zvýšení u 28 % z nich. U zbylých vzorků se koncentrace neměnila. Změna koncentrace OTA s časem nekorelovala s počáteční koncentrací ochratoxinu A, obsahem alkoholu, stupňovitostí ani druhem piva. Koncentrace deoxynivalenolu se v čase neměnila, jak bylo předpokládáno vzhledem ke stabilitě mykotoxinu uváděné v literatuře.

Závěrem lze říci, že celkově byly koncentrace všech analyzovaných mykotoxinů v pivech natolik nízké, aby nepoškozovaly zdraví konzumentů. Stabilita ochratoxinu A v čase nebyla u většiny vzorků prokázána. Naměřené hodnoty koncentrací byly různorodé a bylo by třeba zaměřit další výzkum na tuto problematiku, aby se dosáhlo optimálních výsledků. Koncentrace deoxynivalenolu v pivě zůstala ve všech vzorcích konstantní i po sedmi letech.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- [2] Velíšek, J.: *Chemie potravin* 3. 2. upr. vyd. Tábor: OASSIS, 2002. 331 s. ISBN 80-86659-03-8.
- [3] FREIRE, Luísa a Anderson S. SANT'ANA. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food and Chemical Toxicology* [online]. 2018, 111, 189-205 [cit. 2019-07-25]. DOI: 10.1016/j.fct.2017.11.021. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691517306889>
- [4] PLEADIN, Jelka, Jadranka FRECE a Ksenija MARKOV. *Mycotoxins in food and feed* [online]. Elsevier, 2019, 2019 [cit. 2019-07-14]. Advances in Food and Nutrition Research. DOI: 10.1016/bs.afnr.2019.02.007. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043452619300221>
- [5] CREPPY, Edmond E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* [online]. 2002, 127(1-3), 19-28 [cit. 2018-11-23]. DOI: 10.1016/S0378-4274(01)00479-9. ISSN 03784274. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427401004799>
- [6] MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2003. ISBN 80-7013-395-3.
- [7] URUSOV, A. E., A. V. ZHERDEV a B. B. DZANTIEV. Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* [online]. 2010, 46(3), 253-266 [cit. 2018-11-23]. DOI: 10.1134/S0003683810030038. ISSN 0003-6838. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1134/S0003683810030038>
- [8] Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal* [online]. 2013, 11(6) [cit. 2018-11-27]. DOI: 10.2903/j.efsa.2013.3262. ISSN 18314732. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2013.3262>
- [9] Maul, R., Müller, C., Rieß, S., Koch, M., Methner, F. J., & Irene, N. (2012). Germination induces the glucosylation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in various grains. *Food Chemistry*, 131(1), 274–279.
- [10] HAJŠLOVÁ, J. Mykotoxiny. *Vědecký výbor fytosanitární a životního prostředí* [online]. 2009 [cit. 2019-10-16]. Dostupné na [www: http://www.phytosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf](http://www.phytosanitary.org/projekty/2009/Projekt1.pdf)
- [11] Lancova, K., Hajslova, J., Poustka, J., Krplova, A., Zachariasova, M., Dostalek, P., & Sachambula, L. (2008). Transfer of Fusarium mycotoxins and “masked” deoxynivalenol

- (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(6), 732–744.
- [12] Wolf-Hall, C. E. (2007). Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing. *International Journal of Food Microbiology*, 119(1–2), 89–94.
- [13] BENEŠOVÁ, Karolína, Renata MIKULÍKOVÁ, Sylvie BĚLÁKOVÁ, Zdeněk SVOBODA a Vratislav PSOTA. Identification of substances originating from pathogen - caryopsis interaction and their effect on malt quality. *Kvasny Prumysl* [online]. 2011, 57(1), 2-7 [cit. 2018-12-26]. DOI: 10.18832/kp2011001. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2011001.html>
- [14] KOSTELANSKÁ, Marta, Milena ZACHARIÁŠOVÁ, Zbyněk DŽUMAN, et al. Fusarium mycotoxins in spring barley and their occurrence within the technological chain barley-malt-beer. *Kvasny Prumysl* [online]. 2011, 57(7), 209-214 [cit. 2018-12-26]. DOI: 10.18832/kp2011020. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2011020.html>
- [15] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 1993. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 56.) Food items and constituents. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513568/>
- [16] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1881/2006 ze dne 19. prosince 2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. In: Úřední věstník. L 364 20.12.2006, s. 5 Dostupné také z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>
- [17] BASAŘOVÁ, Gabriela. *Pivovarství: teorie a praxe výroby piva*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-734-7.
- [18] PASCARI, Xenia, Antonio J. RAMOS, Sonia MARÍN a Vicente SANCHÍS. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International* [online]. 2018, 103, 121-129 [cit. 2018-11-23]. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.07.038. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917303642>
- [19] BERTERO, Alessia, Antonio MORETTI, Leon SPICER a Francesca CALONI. Fusarium Molds and Mycotoxins: Potential Species-Specific Effects. *Toxins*[online]. 2018, 10(6) [cit. 2018-11-23]. DOI: 10.3390/toxins10060244. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/10/6/244>
- [20] BĚLÁKOVÁ, Sylvie, Karolína BENEŠOVÁ, Renata MIKULÍKOVÁ a Zdeněk SVOBODA. The Occurrence of Ochratoxin A in Beers. *Kvasny Prumysl* [online]. 2015,

- 61(2), 34-37 [cit. 2018-11-30]. DOI: 10.18832/kp2015005. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2015005.html>
- [21] Beer Statistics – 2017 Edition. In: The Brewers of Europe [online]. Belgium, 2017. [cit. 17. 10. 2019]. ISBN 978-2-9601382-9-0. Dostupné z [www: https://brewersofeurope.org/uploads/mycmsfiles/documents/publications/2017/Statistics-201712-001.pdf](http://www.brewersofeurope.org/uploads/mycmsfiles/documents/publications/2017/Statistics-201712-001.pdf)
- [22] WOLF-HALL, Charlene E. a Paul B. SCHWARZ. Mycotoxins and Fermentation - Beer Production. DEVRIES, Jonathan W., Mary W. TRUCKSESS a Lauren S. JACKSON, ed. *Mycotoxins and Food Safety* [online]. Boston, MA: Springer US, 2002, 2002, s. 217-226 [cit. 2019-08-19]. Advances in Experimental Medicine and Biology. DOI: 10.1007/978-1-4615-0629-4_22. ISBN 978-1-4613-5166-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-0629-4_22
- [23] PASCARI, Xenia, Sonia GIL-SAMARRA, Sonia MARÍN, Antonio J. RAMOS a Vicente SANCHIS. Fate of zearalenone, deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside during malting process. *LWT* [online]. 2019, 99, 540-546 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.10.030. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643818308764>
- [24] VARGA, Elisabeth, Alexandra MALACHOVA, Heidi SCHWARTZ, Rudolf KRŠKA a Franz BERTHILLER. Survey of deoxynivalenol and its conjugates deoxynivalenol-3-glucoside and 3-acetyl-deoxynivalenol in 374 beer samples. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2013, 30(1), 137-146 [cit. 2019-08-11]. DOI: 10.1080/19440049.2012.726745. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2012.726745>
- [25] Solarska, E. Study on cause of Fusarium cone tip blight. In Proceedings of the Scientific Commission CICH–IHB–IHGC, International Hop Growers' Convention, Tettnang, Germany, 24–28 June 2007; pp. 95–97.
- [26] KOSAŘ, Karel a Stanislav PROCHÁZKA. *Technologie výroby sladu a piva*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, 2000, 398 s. ISBN 80-902658-6-3.
- [27] *Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2011. Technical report series (World Health Organization), 959. ISBN isbn9789241209595.
- [28] PIACENTINI, Karim C., Sylvie BĚLÁKOVÁ, Karolína BENEŠOVÁ, et al. Fusarium Mycotoxins Stability during the Malting and Brewing Processes. *Toxins* [online]. 2019, 11(5) [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.3390/toxins11050257. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/5/257>
- [29] Jouany, J.; Yiannikouris, a; Bertin, G. The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Arch. Zootech.* 2005, 26–50.

- [30] SCHWARZ, Paul B., Howard H. CASPER a Samuel BEATTIE. Fate and Development of Naturally Occurring Fusarium Mycotoxins During Malting and Brewing 1. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, 53(3), 121-127 [cit. 2019-08-19]. DOI: 10.1094/ASBCJ-53-0121. ISSN 0361-0470. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-53-0121>
- [31] KOSTELANSKA, Marta, Jana HAJŠLOVÁ, Milena ZACHARIASOVÁ, et al. Occurrence of Deoxynivalenol and Its Major Conjugate, Deoxynivalenol-3-Glucoside, in Beer and Some Brewing Intermediates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2009, 57(8), 3187-3194 [cit. 2019-08-11]. DOI: 10.1021/jf803749u. ISSN 0021-8561. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf803749u>
- [32] DAWSON, Gail F. *Easy interpretation of biostatistics: the vital link to applying evidence in medical decisions*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, c2008. ISBN 9781416031420.
- [33] NAKAJIMA, M., TSUBOUCHI, H. a MIYABE, M., A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J. AOTAC Int.* 1999, vol. 82, issue 4, pp. 897–902 [cit. 2020-03-04]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444830>
- [34] SWARTZ, Michael E. a Ira S. KRULL. *Handbook of Analytical Validation* [online]. CRC Press, 2012 [cit. 2020-03-09]. DOI: 10.1201/b12039. ISBN 9780429132339.
- [35] SULYOK, Michael, Rudolf KRŠKA a Rainer SCHUHMACHER. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2007, 389(5), 1505-1523 [cit. 2019-09-17]. DOI: 10.1007/s00216-007-1542-2. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-007-1542-2>
- [36] PERNICA, Marek, Karim C. PIACENTINI, Karolina BENEŠOVÁ, Josef ČÁSLAVSKÝ a Sylvie BĚLÁKOVÁ. Analytical techniques for determination of mycotoxins in barley, malt and beer: A review. *KVASNY PRUMYSL* [online]. 2019, 65(2), 46-57 [cit. 2019-09-17]. DOI: 10.18832/kp2019.65.46. ISSN 2570-8619. Dostupné z: <http://www.kvasnyprumysl.eu/index.php/kp/article/view/56>
- [37] RAHMANI, A., S. JINAP a F. SOLEIMANY. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2009, 8(3), 202-251 [cit. 2019-09-17]. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2009.00079.x>
- [38] DALL'ASTA, C., G. GALAVERNA, G. AURELI, A. DOSSENA a R. MARCHELLI. A LC/MS/MS method for the simultaneous quantification of free and masked fumonisins in maize and maize-based products. *World Mycotoxin Journal* [online]. 2008, 1(3), 237-246 [cit. 2019-09-20]. DOI: 10.3920/WMJ2008.x040. ISSN 1875-0710. Dostupné z: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2008.x040>

- [39] TURNER, Nicholas W., Sreenath SUBRAHMANYAM a Sergey A. PILETSKY. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2009, 632(2), 168-180 [cit. 2019-09-21]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.11.010. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008019193>
- [40] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [41] NOLLET, Leo M. L. a Fidel. TOLDRÁ. *Food analysis by HPLC*. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, c2013. ISBN 9781439830840.
- [42] HOLZBECHER, Závaš a Jaroslav CHURÁČEK. *Analytická chemie*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury, 1987.
- [43] SWARTZ, Michael E. 6 Contemporary liquid chromatographic systems for method development. HPLC Method Development for Pharmaceuticals [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 145-187 [cit. 2019-09-24]. *Separation Science and Technology*. DOI: 10.1016/S0149-6395(07)80012-2. ISBN 9780123705402. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149639507800122>
- [44] BAXTER, E. Denise, Ian R SLAIDING a Barbara KELLY. Behavior of Ochratoxin A in Brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* [online]. 2018, 59(3), 98-100 [cit. 2019-10-08]. DOI: 10.1094/ASBCJ-59-0098. ISSN 0361-0470. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1094/ASBCJ-59-0098>
- [45] TAMURA, Masayoshi, Atsuo UYAMA a Naoki MOCHIZUKI. Development of a Multi-mycotoxin Analysis in Beer-based Drinks by a Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Sciences* [online]. 2011, 27(6) [cit. 2019-10-16]. DOI: 10.2116/analsci.27.629. ISSN 0910-6340. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/analsci/27.629?from=CrossRef>
- [46] SULYOK, Michael, Franz BERTHILLER, Rudolf KRŠKA a Rainer SCHUHMACHER. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2006, 20(18), 2649-2659 [cit. 2019-09-17]. DOI: 10.1002/rcm.2640. ISSN 0951-4198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.2640>
- [47] PIACENTINI, Karim, Liliana ROCHA, Geovana SAVI, Lorena CARNIELLI-QUEIROZ, Livia DE CARVALHO FONTES a Benedito CORREA. Assessment of Toxicogenic Fusarium Species and Their Mycotoxins in Brewing Barley Grains. *Toxins* [online]. 2019, 11(1) [cit. 2019-11-29]. DOI: 10.3390/toxins11010031. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6651/11/1/31>
- [48] BĚLÁKOVÁ, Sylvie, Karolína BENEŠOVÁ, Josef ČÁSLAVSKÝ, Zdeněk SVOBODA a Renata MIKULÍKOVÁ. The occurrence of the selected fusarium mycotoxins in Czech

- malting barley. *Food Control* [online]. 2014, 37, 93-98 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.09.033. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713513004799>
- [49] PETERS, Jeroen, Ruud VAN DAM, Ronald VAN DOORN, David KATERERE, Franz BERTHILLER, Willem HAASNOOT, Michel W. F. NIELEN a Vijai GUPTA. Mycotoxin profiling of 1000 beer samples with a special focus on craft beer. *PLOS ONE* [online]. 2017, 12(10) [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1371/journal.pone.0185887. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0185887>
- [50] GIL-SERNA, Jéssica, Covadonga VÁZQUEZ a Belén PATIÑO. Mycotoxins | Toxicology. *Reference Module in Food Science* [online]. Elsevier, 2019, 2019 [cit. 2019-12-02]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.22630-9. ISBN 9780081005965. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965226309>
- [51] ANSELME, M., E. K. TANGNI, L. PUSSEMIER, J.-C. MOTTE, F. VAN HOVE, Y.-J. SCHNEIDER, C. VAN PETEGHEM a Y. LARONDELLE. Comparison of ochratoxin A and deoxynivalenol in organically and conventionally produced beers sold on the Belgian market. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2006, 23(9), 910-918 [cit. 2019-12-03]. DOI: 10.1080/02652030600743839. ISSN 0265-203X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030600743839>
- [52] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 466/2001 ze dne 8. března 2001, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. In: Úřední věstník. L 077 16.3.2001, s. 1 Dostupné také z: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/52b2484d-39e0-4aa9-ba19-4b13a887bb1c/language-cs>
- [53] MALACHOVÁ, Alexandra, Elisabeth VARGA, Heidi Elisabeth SCHWARTZ-ZIMMERMANN a Franz BERTHILLER. Analytical strategies for the determination of deoxynivalenol and its modified forms in beer: A mini review. *Kvasny Prumysl* [online]. 2015, 61(2), 46-50 [cit. 2019-12-12]. DOI: 10.18832/kp2015007. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2015007.html>
- [54] KRŠKA, Rudolf, Patricia SCHUBERT-ULLRICH, Alexandra MOLINELLI, Michael SULYOK, Susan MACDONALD a Colin CREWS. Mycotoxin analysis: An update. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2008, 25(2), 152-163 [cit. 2019-12-16]. DOI: 10.1080/02652030701765723. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030701765723>
- [55] PAPADOPOULOU-BOURAOUI, A., T. VRABCHEVA, S. VALZACCHI, J. STROKA a E. ANKLAM. Screening survey of deoxynivalenol in beer from the European market by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Additives and Contaminants* [online]. 2004, 21(6), 607-617 [cit. 2019-12-17]. DOI: 10.1080/02652030410001677745. ISSN 0265-203X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652030410001677745>

- [56] BĚLÁKOVÁ, Sylvie, Simona WAWROSZOVÁ a Karolína BENEŠOVÁ. The Occurrence of Mycotoxins in Beers from Retail Shops. *Kvasny Prumysl* [online]. 2017, 63(6), 293-297 [cit. 2019-12-17]. DOI: 10.18832/kp201728. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp201728.html>
- [57] ZACHARIASOVA, Milena, Tomas CAJKA, Michal GODULA, Alexandra MALACHOVA, Zdenka VEPRIKOVA a Jana HAJŠLOVA. Analysis of multiple mycotoxins in beer employing (ultra)-high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2010, 24(22), 3357-3367 [cit. 2019-12-17]. DOI: 10.1002/rcm.4746. ISSN 09514198. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/rcm.4746>
- [58] BERTUZZI, Terenzio, Silvia RASTELLI, Annalisa MULAZZI, Gianluca DONADINI a Amedeo PIETRI. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. *Food Control* [online]. 2011, 22(12), 2059-2064 [cit. 2019-12-17]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.06.002. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713511002313>
- [59] OMURTAG, Gülden Z. a Diren BEYOĞLU. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC. *Food Control* [online]. 2007, 18(2), 163-166 [cit. 2019-12-17]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.09.007. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713505002173>
- [60] RUBERT, J., J. MAÑES, K.J. JAMES a C. SOLER. Application of hybrid linear ion trap-high resolution mass spectrometry to the analysis of mycotoxins in beer. *Food Additives & Contaminants: Part A* [online]. 2011, 28(10), 1438-1446 [cit. 2019-12-17]. DOI: 10.1080/19440049.2011.595015. ISSN 1944-0049. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2011.595015>
- [61] ZACHARIASOVA, Milena, Jana HAJŠLOVA, Marta KOSTELANSKA, Jan POUSTKA, Alexandra KRPLOVA, Petr CUHRA a Igor HOCHÉL. Deoxynivalenol and its conjugates in beer: A critical assessment of data obtained by enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, 625(1), 77-86 [cit. 2019-12-18]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.07.014. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267008013287>
- [62] BELAJOVA, E., RAUOVA, D. Application of a simple and rapid pre-treatment procedure in the high performance liquid chromatographic analysis of deoxynivalenol and zearalenone in beer. *Journal of Food and Nutrition Research* [online]. 2008, 47(4): 189-199 [cit. 2019-12-18]. Dostupné z: <http://www.vup.sk/index.php?mainID=2&navID=14&start>
- [63] BĚLÁKOVÁ, Sylvie, Karolína BENEŠOVÁ, Renata MIKULÍKOVÁ, Zdeněk SVOBODA a Josef ČÁSLAVSKÝ. Monitoring of the occurrence of deoxynivalenol in beers from outlet shops in 2009-2012. *Kvasny Prumysl* [online]. 2013, 59(10), 292-295

- [cit. 2020-02-08]. DOI: 10.18832/kp2013030. ISSN 00235830. Dostupné z: <http://kvasnyprumysl.cz/doi/10.18832/kp2013030.html>
- [64] *Food & Feed - Food & Feed Analysis* [online]. Copyright © [cit. 11.02.2020]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2014/06/r1311-ochratoxin-a-30-15-19-01-18.pdf>
- [65] *Food & Feed - Food & Feed Analysis* [online]. Copyright © [cit. 19.02.2020]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2012/10/R5906-DON-09-06-22-1.pdf>
- [66] *Food & Feed – Food & Feed Analysis* [online]. Copyright © [cit. 19.02.2020]. Dostupné z: <https://food.r-biopharm.com/wp-content/uploads/sites/2/2013/03/R1401-Zearalenon-12-09-07.pdf>
- [67] Barek, Jiri & Janos, Pavel & Koruna, Ivan & Meloun, Milan & Plzák, Zbyněk & Skacel, Frantisek & Suchánek, M & Tichý, Jan & Vilímc, Jan & Vláčil, František & Zima, Tomáš. (2000). 096. METROLOGICKÁ TERMINOLOGIE V CHEMII. Chemické Listy. 94. 439-444.
- [68] KUZDRALIŃSKI, A., E. SOLARSKA a M. MUSZYŃSKA. Deoxynivalenol and zearalenone occurrence in beers analysed by an enzyme-linked immunosorbent assay method. *Food Control* [online]. 2013, 29(1), 22-24 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.06.003. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956713512003234>
- [69] |HPLC|High Performance Liquid Chromatography|. /HPLC|High Performance Liquid Chromatography| [online]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [70] SCOTT, P. M. a S. R. KANHERE. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Additives and Contaminants* [online]. 1995, 12(4), 591-598 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1080/02652039509374347. ISSN 0265-203X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652039509374347>
- [71] VISCONTI, Angelo, Michelangelo PASCALE, Gianluca CENTONZE, et al. Determination of Ochratoxin A in Wine and Beer by Immunoaffinity Column Cleanup and Liquid Chromatographic Analysis with Fluorometric Detection: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* [online]. 2001, 84(6), 1818-1827 [cit. 2020-03-04]. DOI: 10.1093/jaoac/84.6.1818. ISSN 1060-3271. Dostupné z: <https://academic.oup.com/jaoac/article/84/6/1818/5656861>
- [72] WAWROSZOVÁ, S. Sledování výskytu mykotoxinů v pivech z obchodní sítě. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 84 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Sylvie Běláková, Ph.D..
- [73] SHAPIRO, S. S. a M. B. WILK. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* [online]. 1965, 52(3/4) [cit. 2020-04-16]. DOI: 10.2307/2333709. ISSN 00063444. Dostupné z: <https://www.jstor.org/stable/2333709?origin=crossref>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DON	Deoxynivalenol
FUM	Fumonisin
ZON	Zearalenon
NIV	Nivalenol
AFB1	Aflatoxin B1
OTA	Ochratoxin A
FHB	Fusarium head blight
IARC	International Agency for Research on Cancer
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO	World Health Organization
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
UPLC	Ultra účinná kapalinová chromatografie
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
SLE	Solid – liquid extraction
SPE	Solid – phase extraction
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazol-6-sulfonát)
ONPG	orto-nitrofenyl- β -galaktosid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
PDA	Detektor s diodovým polem (Photodiode-array)
FLR	Fluorescenční detektor MSHmotnostní spektrometrie
GC	Plynová chromatografie
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
ECD	Detektor elektronového záchytu
FID	Plamenoionizační detektor
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
3-ADON	3-acetyldeoxynivalenol
15-ADON	15-acetdeoxynivalenol
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
SPE	Extrakce na pevné fázi
FT-IR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ATR	Zeslabený úplný odraz
t-TDI	Předběžný tolerovatelný denní příjem
TDI	Tolerovatelný denní příjem
TWI	Tolerovatelný týdenní příjem